

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-080201

(43)Date of publication of application : 13.03.1992

(51)Int.Cl.

C08B 37/08
A61K 31/725
A61K 31/73
C08B 37/00
C08B 37/10

(21)Application number : 02-193817

(71)Applicant : SEIKAGAKU KOGYO CO LTD

(22)Date of filing : 24.07.1990

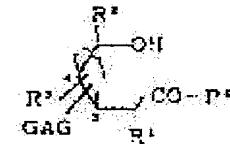
(72)Inventor : SAKURAI KATSUKIYO
SUGIURA NOBUO
KIMATA HIROHARU
SUZUKI AKIRA

(54) PHOSPHOLIPID OR GLYCOSAMINOGLYCAN BONDED TO PHOSPHOLIPID

(57)Abstract:

PURPOSE: To prevent adhesion of cancerous cells to hemangioendotheliocytes or ectocytic matrices and make use as a preventive of cancerous metastasis by providing a phospholipid having a specific structural formula.

CONSTITUTION: One mole of glycosaminoglycan is reacted with 2-20 equivalents of an oxidizing agent at 0-40° C and treated with an acid to give a lactone compd., which is reacted with a phospholipid having a primary amino group to give (a) (salt of) a phospholipid-bonded glycosaminoglycan of the formula [wherein P1 is a phospholipid having a primary amino group; when GAG is a glycosaminoglycan residue formed by removing a glucuronic acid part having a reducing terminal group from hyaluronic acid, chondroitin (sulfate A, C, or E), dermatan sulfate, heparin, or heparan sulfate or when GAG is a glycosaminoglycan residue formed by removing an iduronic acid part having a reducing terminal group from dermatan sulfate, GAG is attached to the 4-position and R3 to the 3-position; R1 is OH; R2 is COOH; and R3 is OH].



⑨ 日本国特許庁 (JP) ⑩ 特許出願公開
 ⑪ 公開特許公報 (A) 平4-80201

⑫ Int. Cl. 5 識別記号 庁内整理番号 ⑬ 公開 平成4年(1992)3月13日
 C 08 B 37/08 Z 7624-4C
 A 61 K 31/725 31/73 ADU 9164-4C
 31/73 9164-4C※
 審査請求 未請求 請求項の数 5 (全35頁)

⑭ 発明の名称 燃脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン
 ⑮ 特願 平2-193817
 ⑯ 出願 平2(1990)7月24日
 ⑰ 発明者 桜井 勝清 東京都東大和市立野3丁目1253番地 生化学工業株式会社
 東京研究所内
 ⑱ 発明者 杉浦 信夫 愛知県愛知郡長久手町岩作字雁又21番地 愛知医科大学分子
 医科学研究所内
 ⑲ 発明者 木全 弘治 愛知県愛知郡長久手町岩作字雁又21番地 愛知医科大学分子
 医科学研究所内
 ⑳ 発明者 鈴木 旺 愛知県愛知郡長久手町岩作字雁又21番地 愛知医科大学分子
 医科学研究所内
 ㉑ 出願人 生化学工業株式会社 東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号
 ㉒ 代理人 弁理士 津国 肇 外1名
 最終頁に続く

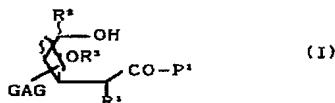
明細書

1. 発明の名称

燃脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン

2. 特許請求の範囲

1. 一般式

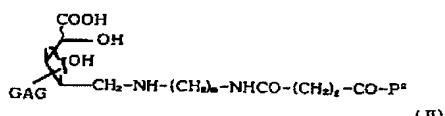


を有する燃脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、R¹はOH、OSO₃H、NHCOCH₃、又はNH₂SO₃Hを示し、R²はCOOH、CH₂OH又はCH₂OSO₃Hを示し、R³は水素又はSO₃Hを示し、GAGはヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、C、EもしくはK、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し、mは1~8を示し、lは1~10を示し、P²は燃脂質又は脂質を示す。

ガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し、P¹は1級アミノ基を有する燃脂質を示す。

2. 一般式

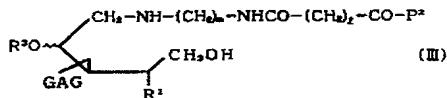


を有する燃脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、GAGはヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、C、EもしくはK、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し、mは1~8を示し、lは1~10を示し、P²は燃脂質又は脂質を示す。

3. 一般式

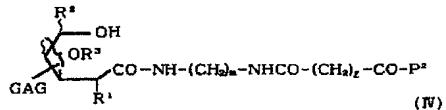
特開平4-80201(2)



を有する糖脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、 R^1 は OH 又は NHCOCH_3 を示し、 R^2 は水素又は SO_3H を示し、GAG はヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸 A もしくは K 又はデルマタン硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基、或いはケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し、 m 、 n 及び P^{\ddagger} は請求項 2 に記載と同じである。

4. 一般式

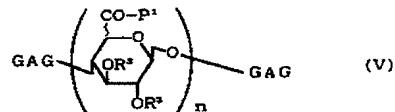


を有する糖脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

又はその塩。

上記式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び GAG は請求項 1 に記載と同じであり、 m 、 n 及び P^{\ddagger} は請求項 2 に記載と同じである。

5. 一般式



を有する糖脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、 R^2 は水素又は SO_3H を示し、GAG はヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸 A、C、D、E もしくは K、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン又はヘパラン硫酸中のグリコサミノグリカン鎖を示し、 P^{\ddagger} は 1 級アミノ基を有する糖脂質を示し、 n はグリコサミノグリカンに存在するカルボキシ基の数以下の数を示す。

3. 発明の詳細な説明

【産業上の利用分野】

本発明は、癌転移抑制剤として有用な糖脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩に関する。

【従来の技術】

癌転移は、血管内やリンパ管内に流出した癌細胞が、血管内皮細胞やその下の基底膜と呼ばれる血管内皮細胞の細胞外マトリックスと接着し、接着した癌細胞が細胞外マトリックス内に浸潤、透過して新しい組織内に転移巣をつくることが知られている。例えば S. Korach らは (Cancer Research 46, 3624-3629, (1986)) 癌細胞のクローニングで高転移性細胞と低転移性細胞の群に分け、培養内皮細胞に対する *in vitro* での接触試験で、高転移性の癌細胞は高い接着率を示し、低転移性のものは低い接着率を示すことから、血管内皮細胞やその細胞外マトリックスに対する接着性が癌の転移と深くかかわっていることを報告している。

また、細胞外マトリックス成分であるフィ

ブロネクチンの細胞接着部位にあるペプチド・G R G D S は、拮抗的に細胞と細胞外マトリックスとの結合を阻害する。山田らは (Science 233, 467-470, (1986)) このペプチド・G R G D S が B 16 F 10 細胞のマウスにおける肺転移を抑制することを示している。このことから、非常に微量で細胞接着阻害活性を持つ物質は癌転移抑制剤として利用し得ることを示唆している。

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、糖脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンが、上記の癌細胞の血管内皮細胞や細胞外マトリックスへの接着を阻害することにより、癌の転移を抑制する知見を得て本発明をなした。

【課題を解決するための手段】

本発明は、下記糖脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩である。

グリコサミノグリカンは表 1 に示すように、D-グルコサミン又は D-ガラクトサミンと、D-グルクロン酸、L-イズロン酸及び/又は D-ガラクトースの 2 糖又は 4 糖の繰り返し単位

より構成されている長い鎖状の多糖であり、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチン硫酸D、コンドロイチン硫酸E、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸及びケラタン硫酸、ケラタンポリ硫酸が知られている。

表 1

グリコサミノグリカン	ヘキソサミン	ウロン酸
ヒアルロン酸 (MW1000~1000万)	GlcNAc	GlcUA
コンドロイチン (MW1000~10万)	GalNAc	GlcUA
コンドロイチン硫酸A (MW1000~10万)	GalNAc(4S)	GlcUA
コンドロイチン硫酸C (MW1000~10万)	GalNAc(6S)	GlcUA
コンドロイチン硫酸D (MW1000~10万)	GalNAc(4S)	GlcUA(2S)
コンドロイチン硫酸E (MW1000~10万)	GalNAc(4S, 6S)	GlcUA
コンドロイチン硫酸K (MW1000~10万)	GalNAc(4S)	GlcUA(3S)
コンドロイチンポリ硫酸 (MW1000~15万)	GalNAc(S)	GlcUA(S)
デルマタン硫酸 (MW1000~2万)	GlcNAc(4S)	IdUA, GlcUA
ヘパリン (MW1000~2万)	GlcNS(6S)	GlcUA, IdUA(2S)
ヘパラン硫酸 (MW1000~2万)	GlcNS(NAc, S)	GlcUA, IdUA(2S)
ケラタン硫酸 (MW1000~2万)	GlcNAc(6S)	Gal
ケラタンポリ硫酸 (MW1000~2万)	GlcNAc(6S)	Gal(6S)

GlcNAc : D-グルコサミンN-アセチル

GalNAc : D-ガラクトサミンN-アセチル

GlcNS : D-グルコサミンN-硫酸

GlcUA : D-グルクロン酸

IdUA : L-イズロニ酸

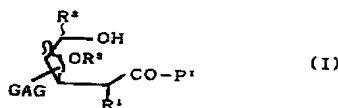
Gal : D-ガラクトース

S : O-硫酸

本発明の焼脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンは、その塩であることができ、好ましくはナトリウム、カリウムのようなアルカリ金属塩：カルシウム、マグネシウムのようなアルカリ土類金属塩：トリアルキルアミン、ビリジンのようなアミン塩であることができる。

本発明の焼脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンは、次のものを包含する。

一般式

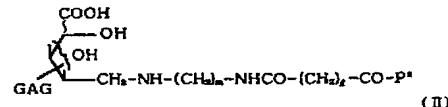


を有する焼脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、R'はOH、OSO₃H、NHCOCH₂又はNH₂SO₃Hを示し、R''はCOOH、CH₂OH又はCH₂OSO₃Hを示し、R'は水素又はSO₃Hを示し、GAGはヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫

酸A、C、D、EもしくはK、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸又はケラタン硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分又はウロン酸部分もしくはガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し、P'は1級アミノ基を有する焼脂質を示す。

一般式



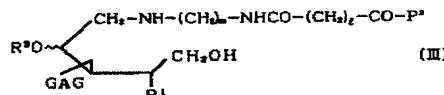
を有する焼脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、GAGはヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、C、EもしくはK、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し、mは

特開平4-80201(4)

1～8を示し、 α は1～10を示し、 P^2 は燐脂質又は脂質を示す。

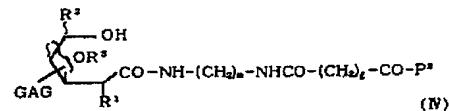
一般式



を有する燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、 R^1 はOH又は NHCOCH_3 を示し、 R^3 は水素又は SO_3H を示し、GAGはヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸AもしくはK又はデルマタン硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基、或いはケラタン硫酸又はケラタンボリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し、 m 、 α 及び P^2 は式(II)に記載と同じである。

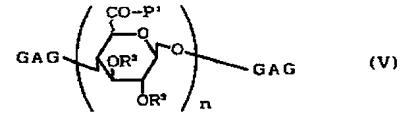
一般式



を有する燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 及びGAGは式(II)に記載と同じであり、 m 、 α 及び P^2 は式(II)に記載と同じである。

一般式



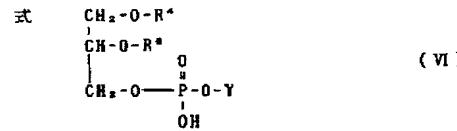
を有する燐脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、 R^3 は水素又は SO_3H を示し、GAGはヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸A、C、D、EもしくはK、コンドロイチンボリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン又はヘパラン硫酸中のグリコサミノグリカン鎖を示し、 P^1 は1級

アミノ基を有する燐脂質を示し、 α はグリコサミノグリカンに存在するカルボキシ基の数以下の数を示す。

グリコサミノグリカンの分子量は好ましくは表1に記載のものが用いられる。

上記式(II)及び(V)の P^1 で示される1級アミノ基を有する燐脂質としては、



(式中、 R^4 及び R^5 はそれぞれ水素、 $-\text{CH}=\text{CHR}^6$ 又は $-\text{COR}^7$ (R^6 及び R^7 は C_{2-4} のアルキル基)であり、Yは $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ 又は $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{COOH}$

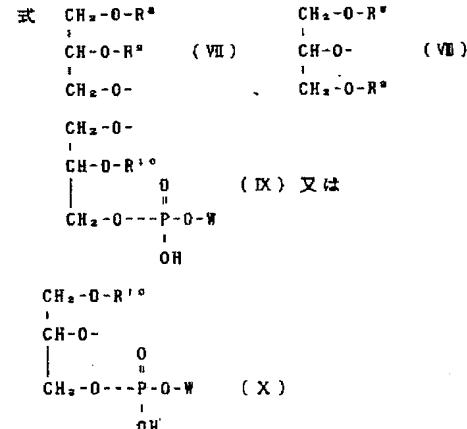
である)

で示されるものが用いられる。特に R^4 及び R^5 がともにヘキサデカノイル又はオクタデカノイルのような $-\text{COR}^7$ であるか、 R^4 が

$-\text{CH}=\text{CHR}^6$ で R^6 が $-\text{COR}^7$

であるものが好ましい。

また、上記式(II)、(III)及び(IV)の P^2 で示される燐脂質又は脂質としては、



(式中、 R^4 、 R^5 及び R^6 はそれぞれ水素、アルキル基、 $-\text{CH}=\text{CHR}^6$ 又は $-\text{COR}^7$ (R^6 及び R^7 は前記と同じ)であり、Wは $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ 又はイノシトール

特開平4-80201(5)

ル残基である)

で示されるものが用いられる。特にR¹及びR¹⁰がともにヘキサデカノイル又はオクタデカノイルのような-COR⁷であるか、R¹が水素で、R¹が-COR⁷である式(VII)又は(VIII)の脂質、或いはR¹⁰が-COR⁷である式(IX)又は(X)の糖脂質が好ましい。

以下に、本発明の糖脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンの製造法について詳しく説明する。

還元末端ラクトン化法

この方法は、グリコサミノグリカンの還元性末端ウロニ酸部分もしくはガラクトース部分又はヘキソサミン部分を酸化することにより該末端糖部分を開裂させ、更にラクトンを形成させて、このラクトンと糖脂質の1級アミノ基との反応により糖脂質結合グリコサミノグリカンを製造する方法である。この方法を反応式で示せば次のとおりである。

ケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸を原料として使用することができる。

この酸化に使用しうる酸化剤としては、ヨウ素、臭素等を用いることができる。

酸化剤の使用量は、式(12)の化合物1モルに対して2~20当量、好ましくは5~15当量の範囲である。

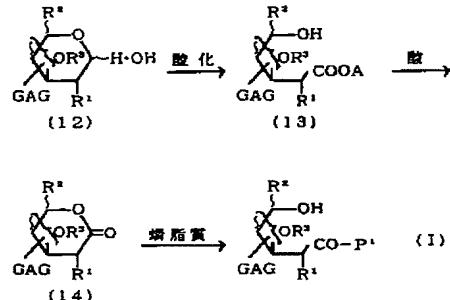
酸化反応における溶媒は、水又は0.05Mリン酸緩衝液(pH7.0)等を用いることができる。

酸化反応温度は、0~40℃、好ましくは15~20℃で行うことができる。

生成する式(13)の化合物は、次いで酸で処理することにより式(14)のラクトン化合物にすることができる。

ここで用いることのできる酸としては、強酸性陰イオン交換樹脂、例えばダウエックス50、アンバーライトIR120等を挙げることができる。

得られる式(14)のラクトン化合物は、次い



(式中、R¹、R²及びR³は前述と同じ、P¹は1級アミノ基を有する糖脂質を示す)

本方法において、先ず、式(12)で示されるグリコサミノグリカンを酸化して還元性末端部分を開裂させ、式(13)のカルボキシ化合物とする。

式(12)のヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチン硫酸D、コンドロイチン硫酸E、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンボリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラン、ヘパラン硫酸、

で糖脂質と反応させることにより、前記一般式(I)の糖脂質結合グリコサミノグリカンを製造することができる。

上記反応に用いることのできる糖脂質としては、L-(α-ホスファチジル)エタノールアミン、D,L-(ホスファチジル-L-セリン、エタノールアミン)ラスマロゲン、セリンラスマロゲン等を用いることができる。

式(14)のラクトン化合物と糖脂質との反応は、水、0.05Mリン酸緩衝液(pH7.0)又はジメチルホルムアミド等に溶解した式(14)のラクトン化合物と、クロロホルム等に溶解した糖脂質とを混合して均一な溶液にし、5~80℃、好ましくは30~60℃の温度で反応させることにより一般式(I)の化合物を製造することができる。

還元末端アミン法

この方法は、次の還元末端限定酸化法で製造される式(3)、(6)、(9)及び(10)のアルデヒド化合物又は前記式(14)のラクトンに

特開平4-80201(6)

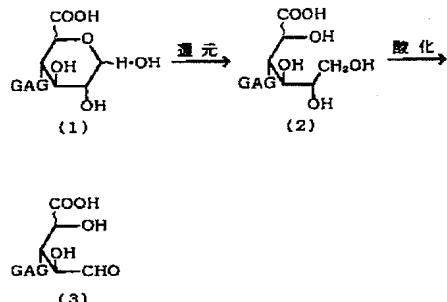
アルキレンジアミンを反応させ、末端に1級アミノ基をもつグリコサミノグリカン誘導体とし、次にこの1級アミノ基をもつグリコサミノグリカン誘導体とカルボキシ基をもつ糖脂質又は脂質誘導体とを反応させ、アミノ基とカルボキシ基との結合により、糖脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンを製造する方法である。

アルデヒド化合物は次のようにして製造される。

還元末端限定酸化法

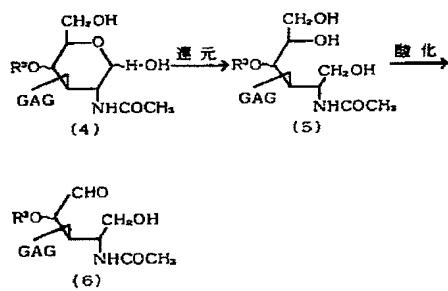
グリコサミノグリカンの還元性末端のウロン酸部分もしくはガラクトース部分又はヘキソサミン部分を還元及び部分酸化することにより開裂させてアルデヒドを形成させる方法である。この方法を反応式で示せば次のとおりである。

(A) 還元性末端糖のグルクロン酸又はイズロン酸に反応する場合



還元性末端がC-2にOHを有するD-グルクロン酸又はL-イズロン酸である式(1)のヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチン硫酸E、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンボリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン又はヘパラン硫酸を原料として使用したとき、上記反応式に従い、式(3)のアルデヒド化合物が製造できる。

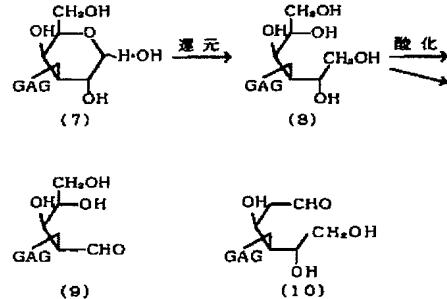
(B) 還元性末端糖のグルコサミン又はガラクトサミンに反応する場合



(式中、R³は前述と同じ)

還元性末端のC-5にCH₂OHを有するグルコサミン又はガラクトサミンである式(4)のヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチンボリ硫酸又はデルマタン硫酸を原料として使用したとき、上記反応式に従い、式(6)のアルデヒド化合物が製造できる。

(C) 還元性末端糖のガラクトースに反応する場合



上記反応式に従い、式(9)及び(10)のアルデヒド化合物が製造できる。

上記(A)、(B)及び(C)の方法においては、先ず、上記式(1)、(4)及び(7)で示されるグリコサミノグリカンを還元して還元性末端糖部分を開裂させて式(2)、(5)及び(8)の化合物とする。

この還元に使用しうる還元剤としては、水素化ホウ素ナトリウム、シアノ水素化ホウ素ナトリウムなどの水素化ホウ素アルカリ塩等を用いることができる。

特開平4-80201(7)

また、上記還元反応における溶媒は、水又は0.05Mホウ酸塩緩衝液(pH8.3)等を用いることができる。

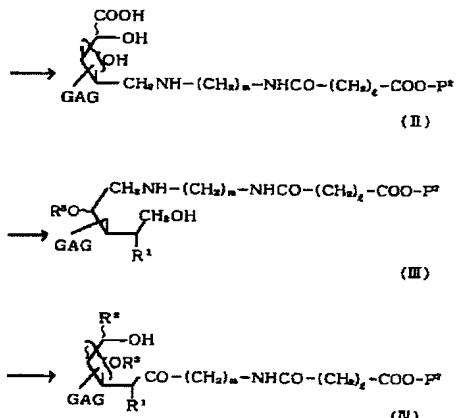
また還元反応温度は、通常10~30℃、好ましくは15~25℃で行うことができる。

還元剤の使用量は、その種類等によっても異なるが、一般には式(1)、(4)又は(7)の化合物1モルに対して5~50当量、好ましくは25~30当量の範囲である。

得られる式(2)、(5)及び(8)の化合物を次いで部分的に酸化すると、式(3)、(6)、(9)及び(10)のアルデヒド化合物が生成する。

この酸化反応に使用しうる酸化剤としては、過ヨウ素酸ナトリウム、過ヨウ素酸カリウムなどの過ヨウ素酸アルカリ塩等を用いることができる。

酸化剤の使用量は、式(2)、(5)又は(8)の化合物1モルに対して1~10当量、好ましくは3~6当量の範囲である。

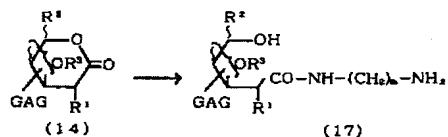
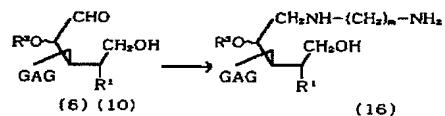
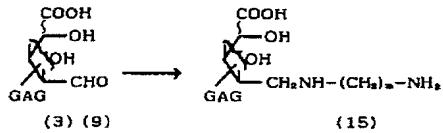


(式中、R¹、R²及びR³は前述と同じ、P²は燐脂質又は脂質を示す)

還元末端に1級アミノ基をもつグリコサミノグリカン誘導体式(15)、(16)及び(17)は、前記還元末端限定酸化法又は還元末端ラクトン化法によって製造される式(3)、(9)、(6)、(10)及び(14)の化合物とアルキレンジアミンとを還元剤の存在下で反応させること

酸化反応温度は、0~10℃、好ましくは0~4℃の範囲で行うことができる。

更に還元末端アミン法を反応式で示せば次のとおりである。



によって得られる。

この反応に使用できるアルキレンジアミンとしては一般式



(式中、mは1~8の整数)

で示される化合物を用いるができる。

還元剤としては、シアノ水素化ホウ素ナトリウム等を用いることができる。

還元剤の使用量は、上記反応に使用するグリコサミノグリカンのモル数の10~100倍モル量である。

反応溶媒は、水又は0.05Mリン酸緩衝液等を用いることができる。

反応温度は、0~60℃、好ましくは4~25℃で行う。

また、カルボキシ基をもつ燐脂質又は脂質誘導体は、グリセロール骨格に水酸基をもつ燐脂質又は脂質とジカルボン酸又はジカルボン酸の無水物とを反応させて得られる。

この反応に使用できる燐脂質又は脂質として

特開平4-80201(8)

は、モノアシルグリセロール、ジアシルグリセロール、リゾホスファチジルコリン又はリゾホスファチジルイノシトール、エーテル脂質又はエーテル塗脂質等を用いることができる。

ジカルボン酸としては、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸等を用いることができる。

無水ジカルボン酸としては、無水マレイン酸、無水コハク酸、無水フマル酸等を用いることができる。

縮合剤としては、1-エチル-3-(ジメチルアミノプロビル)カルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド等を用いることができる。

反応溶媒としては、クロロホルム、アセトアニド、ジメチルホルムアミド等を用いることができる。

反応温度は、縮合剤の存在下でジカルボン酸を使用するときは0~60℃を、また無水ジカルボン酸を使用するときは20~80℃で行うことができる。

縮合剤としては、1-エチル-3-(ジメチルアミノプロビル)カルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド等を用いることができる。

反応温度は、0~60℃で行う。

上記方法によって得られたカルボキシ基が活性化された上記塗脂質誘導体と、1級アミノ基をもつグリコサミノグリカン誘導体(15)、(16)又は(17)とを反応させれば、塗脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン(II)、(III)及び(IV)を得ることができる。

上記反応溶媒としては、クロロホルム、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド又は該溶媒の混合液を用いることができる。

また反応温度は、0~60℃で行う。

縮合剤使用法

ケラタン硫酸及びケラタンポリ硫酸以外のグリコサミノグリカンはD-グルクロン酸又はL-イズロン酸を含有し、これらのウロン酸はC-5にカルボキシ基を有する。

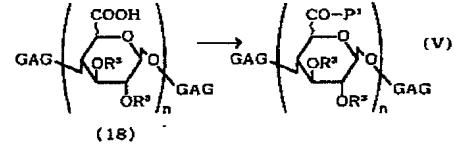
還元末端に1級アミノ基をもつグリコサミノグリカン誘導体とカルボキシ基をもつ塗脂質又は脂質誘導体とを反応させる方法は、先ず該塗脂質又は脂質誘導体をペプチド化学の分野でよく知られている方法に従って該塗脂質又は脂質誘導体のカルボキシ基を活性化し、次いで該グリコサミノグリカン誘導体と反応させる方法で行うことができる。

上記塗脂質又は脂質誘導体のカルボキシ基を活性化する方法としては、上記塗脂質又は脂質誘導体とN-ヒドロキシスクシンイミド、ヨニトロフェノール、N-ヒドロキシベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシビペリジン、N-ヒドロキシスクシンアミド、2、4、5-トリクロロフェノール等とを縮合剤の存在下で反応させ、該カルボキシ基を活性エステルに変える方法で行うことができる。

反応溶媒としては、クロロホルム、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド又は該溶媒の混合液を用いることができる。

この方法は、ウロン酸のカルボキシ基と塗脂質の1級アミノ基とを縮合剤の存在下で反応させ、塗脂質結合グリコサミノグリカンを製造する方法である。

この方法を反応式で示せば次のとおりである。



(式中、R³及びP¹は前述と同じ)

本方法で原料として用いることのできるグリコサミノグリカン(18)は、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチン硫酸D、コンドロイチン硫酸E、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン又はヘパラン硫酸である。

塗脂質としては、前記還元末端ラクトン化法において例示したものを用いることができる。

特開平4-80201(9)

総合剤としては、ジエチルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド、メチルプロピルカルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド、ヘキサメチレンカルボジイミド、ヘプタメチレンカルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボジイミドメソ- α -トルエンスルホネート、1- α -ブチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、ジフェニルカルボジイミド、4,4'-ジニトロジフェニルカルボジイミド、ジ- α -トリルカルボジイミド又はビス(トリメチルシリル)カルボジイミド等を挙げることができる。

総合剤の使用量は、煩脂質又は脂質の使用モル量の10~100倍モル量を用いることができる。

溶媒としては、ジメチルホルムアミド、クロロホルム又は該溶媒の混合液等を用いることができる。

フェノール等を総合剤の存在下で反応させて、該カルボキシ基を活性エステルに変えることができる。

ウロン酸部分のカルボキシ基はそのアミン塩として反応させることもできる。

アミン塩のアミンの種類としては、トリ(エチル)アミン、トリエチルアミン、ピリジン等を挙げることができる。

反応溶媒としては、ジメチルホルムアミド、ピリジン、ジメチルスルホキシド等を用いることができる。

総合剤としては、1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド等を用いることができる。

反応温度は、0~60℃、好ましくは4~20℃で行う。

上記方法によって得られた、カルボキシ基が活性化されたグリコサミノグリカンを煩脂質と反応させれば、一般式(V)の煩脂質結合グリコサミ

反応温度は、4~60℃、好ましくは15~25℃で行う。

グリコサミノグリカン活性化法

この方法は、上記総合剤使用法と同様に、ウロン酸のカルボキシ基を活性化し、煩脂質の1級アミノ基と結合させることにより、煩脂質結合グリコサミノグリカン(V)を製造する方法である。

本方法で使用することのできるグリコサミノグリカン及び煩脂質としては、上記総合剤使用法と同様のものを用いることができる。

カルボキシ基を活性化する方法としては、ペブチド化学の分野でよく知られている方法に従つて、グリコサミノグリカンのウロン酸部分のカルボキシ基を活性化することができる。

活性化する方法としては、例えばグリコサミノグリカンにN-ヒドロキシスクシンイミド、 α -ニトロフェノール、N-ヒドロキシベンゾトリゾール、N-ヒドロキシビペリジン、N-ヒドロキシスクシンアミド、2,4,5-トリクロロ

ノグリカンを得ることができる。

上記反応は、ジメチルホルムアミド、クロロホルム又は該溶媒の混合液の溶媒において、上記活性化グリコサミノグリカンと煩脂質とを0~90℃、好ましくは25~60℃で反応させる。

また、本発明の一般式(I)~(V)で示される煩脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンの煩脂質又は脂質の含有量は、0.005~50%、好ましくは2~10%の範囲である。

以上に述べた各種の方法で製造される煩脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンの分離、精製方法としては、反応液に酢酸ナトリウム飽和エタノールを加えて生じた沈澱物を汎取することで未反応の煩脂質又は脂質を除き、さらに該沈澱物を疎水クロマトに負荷し、酢酸アンモニウム、塩化アンモニウム又は塩化ナトリウム等の塩の水溶液で洗浄することで未反応のグリコサミノグリカンを除去する。この後、該疎水クロマトに吸着した煩脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンを10~50%メタノール水溶液で溶出する方法で行う

特開平4-80201(10)

ことができる。

本発明の焼脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその薬学的に許容される塩を、固体又は液体の医薬用担体又は希釈剤、即ち、賦形剤、安定剤等の添加剤とともに含む製剤とすることが好ましい。

焼脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンの塩は水溶性であるため、注射剤として用いる場合に最適である。該医薬製剤において、前記有効成分の担体成分に対する割合は、1～90重量%の間で変動させうる。

剤形及び投与形態としては、顆粒剤、細粒剤、散剤、錠剤、カプセル剤、丸剤もしくは液剤等の剤形にして、又は原末のまま経口投与してもよいし、注射剤として静脈内投与、筋肉内投与又は皮下投与してもよい。また、坐剤、軟膏剤、バップ剤、貼付剤、リニメント剤、ローション剤等の剤形にして、外用剤として用いることもできる。また、注射用の粉末にして、用時調製して使用してもよい。

である軟膏剤又はバップ剤等として用いる場合は、0.1～10重量%含有していることが好ましい。

臨床投与量は、経口投与の場合、成人に対し有効成分として、1日量100～2000mgを内服することが好ましいが、年令、症状により適宜増減することも可能である。前記1日量を1回、又は適当な間隔をおいて2もしくは3回に分けて投与することが好ましい。

また、注射剤として用いる場合には、成人に対し有効成分として、1回量10～1000mgを投与することが好ましく、軟膏剤又はバップ剤等として用いる場合は、前記含有割合のものを適当量患部に塗布することが好ましい。

【発明の効果】

本発明品の焼脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩は、細胞接着阻害作用を有し、かつ毒性もないので癌転移抑制剤として有用である。

【実施例】

経口、経腸、非経口もしくは局所投与に適した医薬用の有機又は無機の、固体又は液体の担体もしくは希釈剤を、本発明の焼脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩を含む医薬製剤を調製するために用いることができる。水、ゼラチン、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、タルク、動植物油脂、ベンジルアルコール、ガム、ポリアルキレングルコール、石油樹脂、ヤシ油、ラノリン又は医薬に用いられる他のキャリア（担体）は全て、本発明品の担体として用いることができる。また、安定剤、湿润剤、乳化剤や、浸透圧を変えたり、製剤の適切なpHを維持するための塩類を補助薬剤として適宜用いることもできる。

顆粒剤、細粒剤、散剤、錠剤又はカプセル剤の場合には、該医薬製剤は本発明品を5～80重量%含有していることが好ましく、液剤の場合には、1～30重量%含有していることが好ましい。また、注射剤の場合は1～10重量%、坐剤の場合は1～50重量%が好ましい。局所投与用

次に実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は、実施例に限定されるものではない。

以下の実施例において、焼脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンのリン含量、焼脂質又は脂質含量、及びグリコサミノグリカン（GAG）含量は、以下の方法で測定した。

測定法

1. GAGの定量

(1) ウロン酸を含有するGAG：カルバゾール硫酸法 (Bitter-Muir法) ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 4, 330-334 (1952)

(2) ガラクトースを含有するケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸：アンスロン法 Biochem.J. 50, 298-303 (1952)

2. 焼脂質又は脂質の定量

(1) リンの定量：モリブデンブルー法、無機応用比色分析、4、共立出版株式会社、編集代表 平野四藏 130～135頁

(2) 脂肪酸の定量：10～50mgのGAG -

脂質を10mLの1N-水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、100℃で1時間加水分解する。反応液を1N-塩酸水溶液で酸性にした後、クロロホルムで抽出し、クロロホルム相を水で洗浄する。脱水ボウムで乾燥後、減圧下で溶媒を除去。残渣に3%塩酸(ガス)含有メタノールを加え、封管中、100℃で3時間加熱後、石油エーテルで3回抽出する。石油エーテルを3回水洗し、混入した塩酸を除き、脱水ボウムで乾燥後、減圧濃縮し、次の(GLC)用試料とする。

気相液相クロマトグラフィー(GLC)

GC-15A(島津製作所)

充填剤: PEG-HT 5% Uniport HP 60/80

ガスクロ工業機

運転条件: 試料気化室温度 350℃

カラム温度: 190~200℃

カラム: 3φ×2m

流速: N: 4.5 mL/min.

製造例 1

(1) 還元末端限定酸化グリコサミノグリカンの

製造

1) 還元末端残基開環ヒアルロン酸の製造

ヒアルロン酸(鶴冠由来、MW 1万: HA1) 2000mgを200mLの0.05Mホウ酸塩緩衝液(pH 8.3)に溶解し、182mgの水素化ホウ酸ナトリウムを加えて室温で5時間反応させた。酢酸でpH 4.5にしてエタノールを加えて生成物を沈澱させ、次いで生成物をエタノールで洗浄した。これによりロット番号100の還元末端残基開環ヒアルロン酸(R-HA1)を1800mg得た。

2) 還元末端限定酸化ヒアルロン酸の製造

1700mgのR-HA1(ロット番号100)を250mLの40mMイミダゾール(pH 6.5)に溶解し、0℃で139.96mgの過ヨウ素酸ナトリウムを加え、1時間反応させた。反応液にエタノールを加えて生成物を沈澱させ、次いでエタノールで洗浄した。これによりロット番号200の還元末端限定酸化ヒアルロン酸(O-HA)1600mgを得た。

3) 他のグリコサミノグリカンの還元末端限定

酸化物(O-GAG)の製造

ヒアルロン酸(鶴冠由来、MW 5万: HA5, MW15万: HA15)、

コンドロイチン(コンドロイチン硫酸Aから酸性メタノール溶液で脱硫酸したもの、MW1.5万: CH)、

コンドロイチン硫酸C(蚊歎骨由来、MW1万: CS(S1)、MW3万: CS(S3)、MW6万: CS(S6))、

コンドロイチン硫酸A(蚊歎骨由来、MW3万: CS(W))、

デルマタン硫酸(豚皮由来、MW1.5万: DS)、

ヘパリン(豚小腸由来、MW1.5万: Hep)、

ヘパラン硫酸(牛腎由来、MW1.5万: HS)、

ケラタン硫酸(牛角膜由来、MW1.5万: KS)

を原料として上記の1)に準じて表2の条件で還元末端残基開環グリコサミノグリカン(R-GAG)を製造した。ひきつづき、上記の2)の方法に準じて表3の条件で還元末端限定酸化グリコサミノグリカン(O-GAG)を製造した。

表 2

ロット番号	生成物	反応条件 GAG/NaBH ₄ (mg/mg)	収量 (mg)
100-2	R-HA5	5000/94.58	4720
100-3	R-HA15	1000/6.31	971
101	R-CH	1000/63.05	867
102	R-CS(S1)	1000/94.58	880
102-2	R-CS(S3)	1000/31.50	897
102-3	R-CS(S6)	1000/15.76	869
103	R-CS(W)	1000/31.50	823
104	R-DS	150/9.46	130
105	R-Hep	1000/63.05	772
106	R-HS	40/2.55	35
107	R-KS	20/1.28	14.6

実施例 1

還元末端ラクトン化法による燐脂質結合グリコサミノグリカンの製造

(1) 還元末端酸化グリコサミノグリカンの製造

1) 還元末端酸化ヒアルロン酸の製造

500 mgのヒアルロン酸(鶴冠由来、MW1万: HA1)を水10 mlに溶解し、0.1 Mヨウ素のメタノール溶液5 mlを加えて室温で6時間反応させた。その後、反応液に0.1 N水酸化カリウムを約5 ml加えて過剰のヨウ素の色を消失させた。この溶液に酢酸カリウム飽和エタノールを加えて生じた沈澱を沪取し、充分にエタノールで洗浄し、減圧乾燥した。

これによりロット番号400の還元末端酸化ヒアルロン酸423 mgを得た。

ソモジーネルソン法による還元糖の有無: 無

2) 還元末端ラクトンヒアルロン酸の製造

400 mgのロット番号400の還元末端酸化ヒアルロン酸を水10 mlに溶解し、強酸性イオン交

表 3

ロット番号	生成物	反応条件 R-GAG/NaIO ₄ (mg/mg)	収量 (mg)
200-2	O-HA5	4500/77.0	4310
200-3	O-HA15	900/ 5.14	815
201	O-CH	800/45.65	766
202	O-CS (S1)	800/68.48	715
202-2	O-CS (S3)	800/22.83	774
202-3	O-CS (S6)	800/11.41	699
203	O-CS (W)	800/22.83	697
204	O-OS	100/ 5.71	82
205	O-Hep	700/39.95	666
206	O-HS	30/ 1.71	22
207	O-RS	10/ 0.57	7

換樹脂(Dowex 50(H⁺)) 50 mlに1時間を要して通過させ、還元末端ラクトンヒアルロン酸390 mgを含む水溶液を得た。

ソモジーネルソン法による還元糖の有無: 無

上記の水溶液をトリ-*n*-ブチルアミンで中和し、凍結乾燥して還元末端ラクトンヒアルロン酸のトリ-*n*-ブチルアミン塩(ロット番号500)400 mgを得た。

3) 他の還元末端ラクトングリコサミノグリカンの製造方法

コンドロイチン(MW1.5万: CH)、

コンドロイチン硫酸C(MW1万: CS (S1), MW3万: CS (S3)及びMW6万: CS (S6))、

デルマタン硫酸(MW1.5万: DS)、

ヘパリン(MW1.5万: Hep)、及び

ヘパラン硫酸(MW1.5万: HS)

を原料として、上記1)に準じて表4の条件で還元末端酸化グリコサミノグリカンを製造した。ひきつづき、上記2)に準じて表5の条件で還元末端ラクトングリコサミノグリカンを製造した。

表 4

ロット番号	生成物	反応条件 GAG/0.1M-Li/0.1M-KOH (mg/ml/ml)	収量 (mg)	ソモジーネルソン
401	CH-COOK	1000/13.4/13.4	823	—
402	CS (S1)-COOK	1000/19.8/19.8	901	—
402-2	CS (S1)-COOK	1000/3.3/3.3	895	—
402-3	CS (S6)-COOK	1000/4.95/4.95	913	—
404	DS-COOK	100/0.67/0.67	91	—
405	Hep-COOK	1000/6.7/6.7	902	—
406	HS-COOK	100/1.34/1.34	88	—

ソモジーネルソン: ソモジーネルソン法による還元糖の有無(有は+、無は-で示す)

特開平 4-80201 (13)

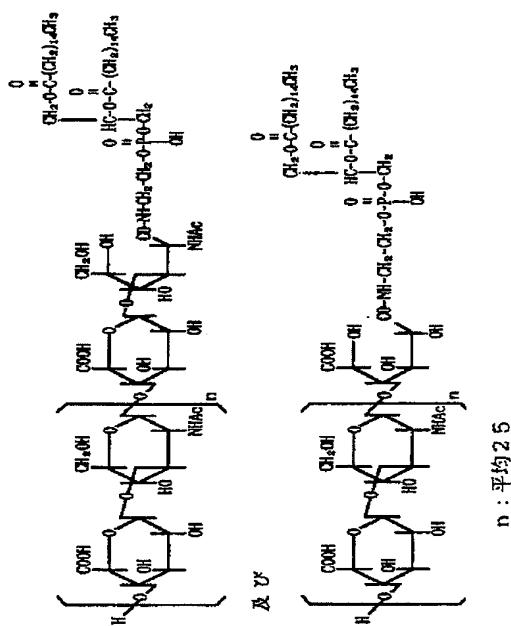
(2) L-(α-ホスファチル)エタノールアミン・ジバルミトイル結合グリコサミノグリカン(GAG-PPEADP)の製造

1) L-(ロホスファチジル)エタノールアミン・ジバルミトイル結合ヒアルロン酸の製造

5

ロット番号	生 成 物	反応 条 件 GAG-COOK/Howerz50 (H ⁺) (mg/ml)	吸 収 (mg)	ソモジ ネルソン
501	CH-ラクトン	800/400	780	-
502	CS (S1)-ラクトン	900/450	805	-
502-2	CS (S3)-ラクトン	800/400	850	-
502-3	CS (S6)-ラクトン	900/450	887	-
504	DS-ラクトン	90/100	96	-
505	Hep-ラクトン	900/400	946	-
506	HS-ラクトン	80/40	72	-

ツモジーネルソン：ソモジーネルソン法による還元率の有無（有は+、無は-で示す）



11: 平均25

400 mgのロット番号500の還元末端ラクトンヒアルロン酸を200 mlのジメチルホルムアミドに溶解し、27.6 mgのPPEADPのクロロホルム溶液を加えて、70℃で2時間反応させ、クロロホルムを溜去し、過剰の酢酸ナトリウム水溶液を加えてナトリウム塩にしてから、酢酸ナトリウム飽和エタノールを加えた。生じた沈澱を汎取し、0.3 M 酢酸アンモニウム溶液に溶解し、疎水クロマトカラム (TSKgelフェニルトヨバル 650 M 400 ml) に吸着し、充分に0.3 M 塩化アンモニウム水溶液で洗浄し、30%メタノール水溶液で溶出した。素通り及び洗浄画分に未反応のHAIが溶出され、30%メタノール水溶液の画分に目的とする本品が溶出した。30%メタノール水溶液溶出画分を減圧下濃縮し、透析で脱塩後、凍結乾燥して精製し、ロット番号600の目的物3.6 mgを得た。

リン含量: 0.30%

PPEADP含量：6.44%

ヒアルロン酸含量: 82.37%

疎水クロマトグラフ：図-1に示す。

疎水クロマトグラフィの条件

カラム：TSK gel フェニル5PW
(7.5φ × 7.5cm)

溶媒：0～5分 0.3M塩化アンモニウム
水溶液

5～50分 30%メタノール水溶液

溶出速度：0.5ml/分

圧：7kg/0.5cm²

分画容量：1ml/管

検出：OD_{220nm}

検体：100μl (1mg/ml 0.3M塩化アンモニウム水溶液)

2) その他のL-(α-ホスファチジル)エタノールアミン・ジバルミトイール結合グリコサミノグリカンの製造

表5に示した還元末端ラクトングリコサミノグリカンとPPEADPとを表6に示した条件で、上記(2)-(1)の方法に準じて製造した。得られた生成物の分析値を表7に示した。

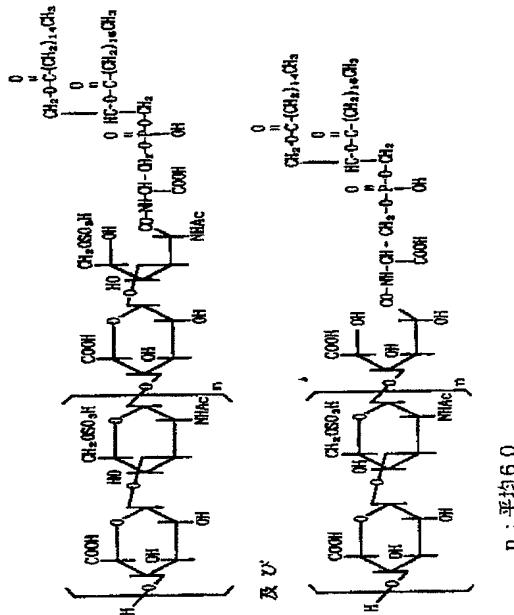
表 6

ロット番号	生成物	反応条件(mg/mg) GAG-ラクトン/PPEADP
601	CH-PPEADP	700/32.3
602	CS(S1)-PPEADP	800/55.4
602-1	CS(S3)-PPEADP	400/9.26
602-3	CS(S6)-PPEADP	800/9.00
604	DS-PPEADP	90/4.15
605	Hep-PPEADP	800/36.91
606	HS-PPEADP	70/3.31

表 7

ロット番号	生成物	収量 (mg)	PPEADP (%)	GAG (%)
601	CH-PPEADP	70.2	4.30	90.90
602	CS(S1)-PPEADP	88.0	6.41	85.17
602-1	CS(S3)-PPEADP	20	2.01	89.70
602-3	CS(S6)-PPEADP	56.2	1.08	92.00
604	DS-PPEADP	4.5	4.00	90.66
605	Hep-PPEADP	24	4.11	90.01
606	HS-PPEADP	5.74	4.22	88.21

(3) ホスファチジルセリンステアロイルバルミトイール結合コンドロイチン硫酸Cの製造



400mgのロット番号500-2の還元末端ラクトンコンドロイチン硫酸Cを200mlのジメチルホルムアミドに溶解し、9mgのホスファチジルセリンステアレートバルミテートのクロロホルム溶液を加えて、70℃で2時間反応させた。クロロホルムを溜去し、過剰の酢酸ナトリウム水溶液を加えてナトリウム塩にしてから、酢酸ナトリウム飽和エタノールを加えて生じた沈澱を汎取した。沈澱を0.3M塩化アンモニウム溶液で溶解し、実施例1-(2)-1に準じて処理した。これによりロット番号700-2のホスファチジルセリンステアロイルバルミトイール結合コンドロイチン硫酸Cを20.8mg得た。

リン含量：0.10%

コンドロイチン硫酸C含量：86.15%

疎水クロマトグラフ：図-2に示す。

測定条件は前記と同じ。

実施例2

還元末端アミン法による糖脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンの製造

(1) 遠元末端アミノーグルコサミノグリカンの
製造

1) 末端アミノーコンドロイチン硫酸 C (CS(S3)) の製造

100mgのロット番号202-2の還元末端残基開環コンドロイチン硫酸Cを50mMの0.05Mリン酸塩緩衝液(pH7.0)に溶解し、24mgのエチレンジアミン塩酸塩を加えて50℃で30分反応させた。その後、20mgのシアノ水素化ホウ素ナトリウムを加えて50℃で2時間反応させた。反応液に酢酸ナトリウム飽和エタノールを加えて生じた沈澱を汎取した。沈澱を水に溶解し、透析により脱塩し、50mMのDEAE-イオン交換樹脂に吸着させ、0.1M食塩水溶液から1M食塩水溶液のグラジエントで溶出した。0.4M食塩濃度で還元末端アミノーコンドロイチ硫酸Cが溶出され、遊離のコンドロイチ硫酸Cは0.75M食塩濃度で溶出した。0.4M食塩溶液画分を透析により脱塩し、凍結乾燥し、ロット番号802-2の還元末端アミノ

10 g のジシクロヘキシルカルボジイミドを加えて室温で20時間反応させた。反応液を減圧濃縮して、沈澱をベンゼン／ナーケサンで再結晶し、ロット番号GMS-1の標記活性エステル7.4 gを得た。

(3) グリセロールモノステアレート結合コンドロイチン硫酸Cの製造

—コンドロイチン硫酸 C 8.0 mgを得た。

2) 通常末端アミノーヘパリン (Hep) の製造

上記の方法に準じて、100 mgのロット番号
205還元末端限定酸化ヘパリンを使用し、ロッ
ト番号805の還元末端アミノ-ヘパリン77 mg
を得た。

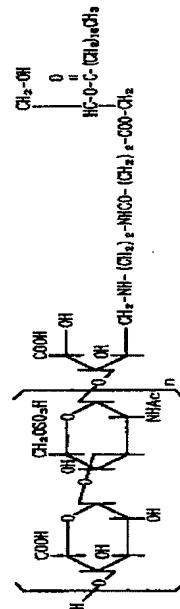
(2) 脂質のコハク酸誘導体の製造

1) グリセロールモノステアレートのコハク酸 エステルの製造

10.74 g のグリセロールモノステアレートを 3 mL のピリジンを含む 200 mL のベンゼンに溶解し、6 g の無水コハク酸を加えて 6 時間還流した。反応液を減圧濃縮し、生じた沈殿をアセトンで再結晶し、グリセロールモノステアレートのコハク酸エステル 8.2 g を得た。

2) グリセロールモノステアレートのコハク酸
エステルをN-ヒドロキシコハク酸イミドによる
活性エステルの製造

上記1)のエステル8 gをベンゼンに溶解して、2 gのN-ヒドロキシコハク酸イミドを加え、



特開平4-80201(16)

8.0 mgのロット番号802-2の還元末端アミノーコンドロイチン硫酸Cを5 mlの水に溶解し、6.95 mgのロット番号GMS-1の活性エスチルのジメチルホルムアミド溶液を加えて室温で20時間反応させた。反応液に酢酸ナトリウム飽和エタノールを加え、生じた沈澱を沪取した。沈澱を0.3 M塩化アンモニウム水溶液に溶解し、実施例1-(2)-1に準じて精製し、ロット番号902-2の標記目的物3.8 mgを得た。

ステアリン酸含量：0.86%

コンドロイチン硫酸C含量：98.2%

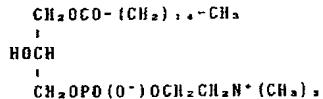
疎水クロマトグラフ：図-2に示す。

測定条件は前記と同じ。

(4) 植脂質のコハク酸誘導体の製造

1) リゾレシチンのコハク酸エステルの製造

次式のリゾレシチン



4.95 mgをクロロホルム200 mlに溶解し、無水

コハク酸100 mgと7.9 mgのビリジンを加えて室温で20時間反応させた。反応液を減圧濃縮し、生じた沈澱をアセトンで再結晶し、リゾレシチンのコハク酸エステルを得た。

2) リゾレシチンのコハク酸エステルのN-ヒドロキシコハク酸イミドによる活性エスチルの製造

上記エスチル2.88.5 mgをジメチルホルムアミドに溶解し、5.7.5 mgのN-ヒドロキシコハク酸イミドと10.3 mgのジシクロヘキシルカルボジイミドを加えて室温で20時間反応させた。沈澱を除去し、上記活性エスチルのジメチルホルムアミド溶液を得た。

(5) リゾレシチン結合グリコサミノグリカンの製造

1) リゾレシチン結合コンドロイチン硫酸Cの製造

上記(4)-2で得られた上記活性化エスチルのジメチルホルムアミド溶液にロット番号802-2の還元末端アミノーコンドロイチン硫酸C1 gの水溶液を加えて室温で20時間反応させた。精製は実施例1に準じて、疎水クロマトグラフィーで精製した。

収量：0.52 g

リン含量：0.105%

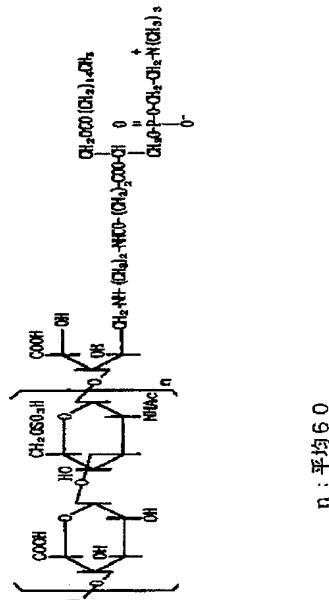
リゾレシチン含量：1.96%

コンドロイチン硫酸C含量：98.04%

イオウ含量：5.78%

(6) グルセロールジステアレート結合コンドロイチン硫酸Cの製造

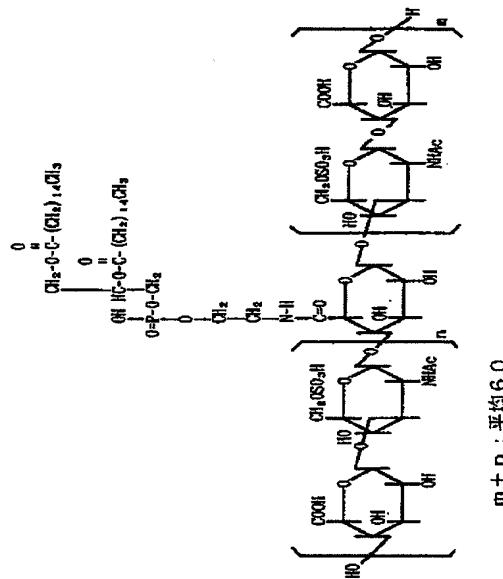
上記(1)-1で得られたロット番号802-2の還元末端アミノーコンドロイチン硫酸Cと上記(2)-2と同様な方法で得られたグリセロールジステアレートのコハク酸エスチルの活性エスチル(ロット番号GDS-2)とを、上記(3)に準じて反応させ、精製して、ロット番号904の標記化合物2.7 mgを得た。



実施例3

複合剤使用法による糖脂質結合グリコサミノグリカンの製造

(1) L-(α -ホスファチジル)エタノールアミン・ジバルミトイール結合コンドロイチン硫酸Cの製造



400 mgのコンドロイチン硫酸C (CS(S3)) のトリエチルアミン塩を100 mlのジメチルホルムアミドに溶解し、6.92 mgのPPEADPのクロロホルム溶液を加えた。更に、38.4 mgの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩を加えて室温で20時間反応させた。反応液を減圧下で濃縮し、過剰の酢酸ナトリウム水溶液を加えてナトリウム塩にした。この水溶液にエタノールを加えて生じた沈澱を汎取した。沈澱を0.3 M塩化アンモニウム水溶液に溶解し、実施例1-(2)-1)に準じて精製し、ロット番号1002-2の標記目的物を63 mg得た。

リン含量: 0.099%

PPEADP含量: 2.25%

コンドロイチン硫酸C含量: 96.61%

疎水クロマトグラフィ: 図-3に示す

カン (GAG-PPEADP) の製造

各種のグリコサミノグリカンとPPEADPとを表8に示した条件で上記(1)の方法に準じて糖脂質結合グリコサミノグリカンを製造した。得られた生成物の分析値を表9に示した。

表 8

ロット番号	生成物	反応条件 (mg/mg/mg) GAG ^{**} /PPEADP/WSG
1000	HAI-PPEADP	420/20.76/103
1001	CH-PPEADP	420/13.84/68.8
1002-1	CS(S1)-PPEADP	400/20.76/103
1002-3	CS(S6)-PPEADP	400/3.46/17.2
1003	CS(W)-PPEADP	400/6.92/34.3
1004	DS-PPEADP	40/1.38/6.88
1005	Hep-PPEADP	400/13.8/68.8
1006	HS-PPEADP	13/0.46/2.3

*1: トリ-*n*-ブチルアミン塩

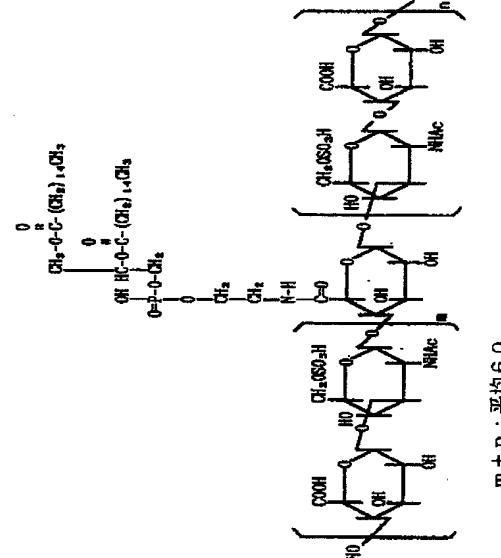
表 9

ロット番号	生成物	収量 (mg)	PPEADP (%)	GAG (%)
1000	HAI-PPEADP	28	6.21	90.05
1001	CH-PPEADP	25.8	4.01	88.64
1002-1	CS(S1)-PPEADP	51.9	5.28	92.40
1002-3	CS(S6)-PPEADP	42.2	1.04	97.81
1003	CS(W)-PPEADP	41.9	2.17	96.62
1004	DS-PPEADP	29	4.41	89.12
1005	Hep-PPEADP	101.3	4.04	90.03
1006	HS-PPEADP	1.2	4.00	88.22

実施例 4

グリコサミノグリカン活性化法による構脂質結合グリコサミノグリカンの製造

(1) L- (ローホスファチジル) エタノールアミン・ジバルミトイル結合コンドロイチン硫酸Cの製造



400 mgのコンドロイチン硫酸C (CS(S3)) のトリ-*n*-ブチルアミン塩を300 mlのDMFに溶解し、9.9 mgのN-ヒドロキシスクシニミドと20.6 mgのジシクロヘキシカルボジイミドを加えて室温で20時間反応させた。反応液に過剰の酢酸ナトリウム水溶液を加えてナトリウム塩にしてからにエタノールを加えて生じた沈澱を汎取した。即座に30 mlの水で溶解し、6.92 mgのPPEADPのクロロホルム溶液を加えて、更にジメチルホルムアミドを加えて均一な溶液とした。室温で6時間反応させ、反応液を減圧濃縮して、酢酸飽和のエタノールを加えた。生じた沈澱を0.3 M 酢酸アンモニウム水溶液に溶解し、実施例1-(2)-(1)に準じて精製し、ロット番号1102-2の標記の目的物を29.7 mg得た。

リン含量: 0.100%

PPEADP含量: 2.16%

コンドロイチン硫酸C含量: 95.98%

疎水クロマトグラフィ: 図-4に示す

測定条件は前記と同じ

(2) L-(α -ホスファチジル)エタノールアミン・ジバルミトイル結合コンドロイチンポリ硫酸の製造

1 g のコンドロイチンポリ硫酸 (CSP(II)) のトリ- n -ブチルアミン塩 (イオウ含量 13.0 %, 分子量 10000) を 50 μ l のジメチルホルムアミドに溶解し、1770 mg の N-ヒドロキシスクシンイミドと 318 mg のジシクロヘキシルカルボジイミドを加えて 4°C で一晩反応させた。反応液に 10 ml の水を加えて室温で 15 分間反応させ、生じた沈澱を除去した後、この溶液に 69.2 mg のホスファチジルエタノールアミン・ジバルミトイル (PPEADP) のクロロホルム溶液を加えて室温で 6 時間反応させた。反応液を減圧濃縮し、酢酸ナトリウム飽和のエタノールを加えて生じた沈澱を集めた。沈澱を 0.3 M の酢酸アンモニウム水溶液に溶解し、実施例 1-(2)-1) に準じて精製し、ロット番号 1108 の標記の目的物 6.7 mg を得た。

不活性化した後、遊離した細胞を遠心により集めた。細胞は 2 回洗浄後、1 mlあたり 1×10^5 個細胞となるように単一細胞懸濁液とした。

得られた単一細胞懸濁液 100 μ l (1×10^4 個細胞) を、上記フィブロネクチンと脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンを塗布した培養皿に加え、37°C で 1 時間処理した。接着しなかった細胞を洗浄した後、接着した細胞を 2% ホルムアルデヒドで固定し、直接位相差顕微鏡で観察して、その細胞数をカウントした。

結果を表 10 に示す。表 10 は、各濃度における細胞接着の変動を示す。値は 3 回ないし 4 回の測定の平均を示し、誤差 (標準偏差) もあわせて表した。

なおそれぞれの遊離グリコサミノグリカンおよび未結合の脂質のみでは高濃度にしても全く細胞接着阻害効果を示さなかった。

リン含量: 0.291%

PPEADP含量: 6.5%

コンドロイチンポリ硫酸含量: 92.8%

イオウ含量: 12.05%

疎水クロマトグラフィ: 図-5 に示す

測定条件は前記と同じ

参考例 1

フィブロネクチンを子め塗布した培養皿に塗布した脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンの BHK 21 細胞の接着に対する効果

96 穴培養皿を 5 μ g/ml ウシ血漿フィブロネクチン 100 μ l で塗布した後、洗浄し、実施例 1-4 で得た各種脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン 100 μ l / 穴を表 10 に示す各濃度で塗布した。

別に、100 mm 程の培養皿に培養した BHK 21 細胞 (新生ハムスター腎細胞) を 0.1 mg/ml の濃度のトリプシン溶液 5 ml を加え、37°C で 5 分間処理した。次いで、1 mg/ml の大豆トリプシンインヒビター溶液 5 ml を加え、トリプシンを

10

(μg/ ml) ロット番号	600 (Mg-PPEADP)			601 (Mg-PPEADP)			602 (Ca ²⁺)-PPEADP			602-2 (Ca ²⁺)-PPEADP		
	0.1	0.2	0.5	1	2	5	10	20	50	100	200	
0.1	87.45± 8.8%	89.15± 15.3%	50.25± 5.2%	24.45± 0.5%	2.45± 2.4%	12.85± 2.4%	6.85± 0.4%	3.75± 0.4%	1.75± 0.1%	0.75± 0.1%	0.35± 0.05%	0.3%
0.2	82.85± 4.8%	48.85± 4.15%	44.75± 6.8%	35.45± 5.5%	33.55± 6.5%	35.45± 6.5%	35.45± 1.3%	35.45± 0.4%	35.45± 0.4%	35.45± 0.4%	35.45± 0.4%	3.8%
0.5	82.85± 4.8%	48.85± 4.15%	44.75± 6.8%	35.45± 5.5%	33.55± 6.5%	35.45± 6.5%	35.45± 1.3%	35.45± 0.4%	35.45± 0.4%	35.45± 0.4%	35.45± 0.4%	4.15%
1	89.15± 15.3%	50.25± 5.2%	23.55± 5.5%	12.85± 2.4%	6.85± 0.4%	3.75± 0.4%	1.75± 0.1%	0.75± 0.1%	0.35± 0.05%	0.35± 0.05%	0.35± 0.05%	0.1%
2	85.05± 2.6%	61.85± 6.0%	80.55± 6.9%	6.05± 0.5%	6.95± 0.5%	2.75± 0.05%	3.25± 1.1%	3.25± 1.1%	3.25± 1.1%	3.25± 1.1%	3.25± 1.1%	0.1%
5	73.55± 1.3%	72.55± 8.8%	6.85± 0.8%	6.85± 0.8%	6.85± 0.8%	2.75± 0.05%	3.25± 1.1%	3.25± 1.1%	3.25± 1.1%	3.25± 1.1%	3.25± 1.1%	0.1%
10	72.55± 8.8%	6.85± 0.8%	6.85± 0.8%	6.85± 0.8%	6.85± 0.8%	2.75± 0.05%	3.25± 1.1%	3.25± 1.1%	3.25± 1.1%	3.25± 1.1%	3.25± 1.1%	0.1%
20	79.95± 2.65	63.85± 2.75	65.55± 10.0%	65.55± 10.0%	65.55± 10.0%	2.75± 0.05%	3.25± 1.1%	3.25± 1.1%	3.25± 1.1%	3.25± 1.1%	3.25± 1.1%	0.1%
50	3.65± 0.15	0.15	44.45± 4.25%	44.45± 4.25%	44.45± 4.25%	4.25± 0.25	33.85± 3.85%	33.85± 3.85%	33.85± 3.85%	33.85± 3.85%	33.85± 3.85%	3.85%
100	0.35± 0.25	0.25	33.85± 3.85%	33.85± 3.85%	33.85± 3.85%	3.85± 0.25	33.85± 3.85%	33.85± 3.85%	33.85± 3.85%	33.85± 3.85%	33.85± 3.85%	3.85%
200	0.35± 0.25	0.25	33.85± 3.85%	33.85± 3.85%	33.85± 3.85%	3.85± 0.25	33.85± 3.85%	33.85± 3.85%	33.85± 3.85%	33.85± 3.85%	33.85± 3.85%	3.85%

ロット番号 (ml/m ³)	602-3 (CS ISG)-PPEADP)	604 (ISG-PPEADP)	605 (ISG-PPEADP)	606 (ISG-PPEADP)
0.1	98.95± 89.39±	0.95± 0.53	85.86± 80.29±	4.65± 3.65
0.2	85.05±	1.13	—	—
0.5	40.04±	3.65	—	—
1	12.75±	1.04	—	—
2	1.65±	0.74	14.93± 6.74±	2.05 1.23
5	1.35±	0.55	60.55±	6.95
10	0.06±	0.05	44.05± 0.65	5.05± 0.65
20	—	—	46.05± 0.65	5.05± 0.65
50	—	—	7.35± 1.35±	1.35± 3.45
100	—	—	17.35± 11.65±	1.05± 2.25
200	—	—	11.65±	0.05± 0.05

ロット番号 (μl/mf)	1,000 [H3-PPEADP]	1,002-2 [Cs33]-PPEADP	1,004 [Cs33]-PPEADP	1,005 [Hep-PPEADP]
0.1				
0.2				
0.5				
1				
2				
5				
10				
20				
50				
100				
200				

参考例 2

各種培養細胞の細胞接着物質に対する燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンの接着阻害効果
 実施例1～4で得た燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンについて、BHK21細胞（新生ハムスター腎細胞）、CEF（ニワトリ胚線維芽細胞）、B16F10（高転移性マウスマラノーマ細胞）、CHO（チャイニーズハムスター卵巣細胞）、及びbaEC（ウシ大動脈内皮細胞）の各種細胞群に対しての、フィプロネクチン（FN）、ラミニン（LN）、I型コラーゲン（Col1）及びビトロネクチン（VN）による接着に対する阻害効果を検討した。

各 5 μ ～ 7 μ のウシ血漿フィブロネクチン、マウス E H S 脛癌細胞由来ラミノン、ラット腿由来 I 型コラーゲン、及びウシ血清ビトロネクチンをそれぞれ 9.6 穴培養皿に塗布し、参考例 1 と同様にして、実施例 1 ～ 4 で得た培脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンを塗布した後、それぞれ B H K 2 1 細胞、 C E F 細胞、 B 1 6 F 1 0 細

胞、CHO細胞、及び β EC細胞の単一細胞懸濁液 $100\mu\text{l}$ (1×10^4 個細胞) を加え細胞接着の変動を見た。対照として磷脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンを添加せず、接着物質のみの細胞接着を 100% とした。結果を表11に示す。

なお、表11中で相対接着細胞数として、全くあるいは殆ど細胞接着しなかった場合（0～10%未満）を-、10～30%未満を+、30～50%未満を++、50～70%未満を+++、70～90%未満を++++、そして90～100%の細胞が接着した場合を+++++と半定量的に表した。

卷 11

ロット番号	用量 (μg/ml)	細胞/接着物質 (5 μg / ml)							
		BHK 21		CEF		B16F10		CHO	
		FN	VN	FN	VN	FN	VN	FN	LN
600 (HAI-PEPADP)	10	+++							
601 (CH-PEPADP)	10	+++							
602 (CS (S1) -PEPADP)	10	+							
602-2 (CS (S3) -PEPADP)	10	-							
702-2 (CS (S3) -P-S)	10	-							
602-3 (CS (S6) -PEPADP)	10	-							
604 (DS-PEPADP)	10	-							
605 (Rep-PEPADP)	10	-	+++						
606 (RS-PEPADP)	10	+							
100 (RS-PEPADP)	100	-							
902-2 (CS (S3) -GDS)	10	++++							
904 (CS (S3) -GDS)	10	+++							
1000 (HAI-PEPADP)	10	++++							
1001 (CH-PEPADP)	100	+++							
1002 (CS (S1) -PEPADP)	10	+++							
1002-2 (CS (S3) -PEPADP)	10	++							
1002-3 (CS (S6) -PEPADP)	10	++							
1003 (CS (W) -PEPADP)	10	-							
1004 (DS-PEPADP)	10	+++							
1005 (Rep-PEPADP)	10	++							
1006 (RS-PEPADP)	10	++							
1008 (CS (W) -PEPADP)	10	+++							

細胞 / 接着物質 (5 μl / ml)

細胞／培養物質(5 μl / ml)	細胞増殖抑制率(%)						CHO
	BHK21	CEF	BSF10	LN	FN	LN	
	FN	WN	FN	WN	FN	LN	
Hal	100	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
HA5	100	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
HA15	100	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
CH	100	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
CS (S1)	100	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
CS (S2)	100	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
CS (S6)	100	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
CS (W)	100	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
DS	100	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
Hep	100	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
HS	100	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
XS	100	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
CPS (II)	100	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
PPEAP	100	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++

ロット番号	用 量 (μ g/ ml)	細胞/接着物質 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)		
		b a EC		Coll
		F	N	
600 (HAI-PPEADP)	10	+	-	++
	100	-	-	-
601 (CH-PPEADP)	10	++++	++	++++
	100	++	-	++
602 (CS (S1)-PPEADP)	10	-	-	+
	100	-	-	-
602-2 (CS (S3)-PPEADP)	10	-	-	-
	100	-	-	-
602-3 (CS (S6)-PPEADP)	10	-	-	-
	100	-	-	-
604 (DS-PPEADP)	10	-	-	++
	100	-	-	-
605 (Hep-PPEADP)	10	++	-	+++
	100	+	-	++
606 (HS-PPEADP)	10	++	-	++
	100	-	-	-
HAI	100	++++	-	++++
CH	100	++++	-	++++
CS (S1)	100	++++	-	++++
CS (S3)	100	++++	-	++++
CS (S6)	100	++++	-	++++
DS	100	++++	-	++++
Hep	100	++++	-	++++
HS	100	++++	-	++++
PPEADP	100	++++	-	++++

特開平4-80201(22)

参考例3

血管内皮培養細胞の細胞外マトリックスにおける高転移性癌細胞の接着に対する磷脂質結合コンドロイチン硫酸Cの抑制効果

マウス由来血管内皮細胞を24穴のI型コラーゲンでコートした培養皿で集密状態になるまで培養し、細胞単層に0.5%トリトンX-100で室温30分間処理し、破壊された細胞片をダルベッコの緩衝液 (Dulbecco's PBS (+))で洗浄して内皮細胞の細胞外マトリックスを得た。

一方、100mm径の培養皿に培養したマウス由来高転移性癌細胞B16F10に5mgトリプシン溶液 (0.1mg/ml PBS (-))を加え、37℃で5分間処理した。次いで、大豆トリプシン阻害剤5mg (1mg/ml)を加え、トリプシンを不活性化した後、遊離した細胞を遠心により集めた。さらに細胞をリン酸塩緩衝液 (PBS(-))で2回洗浄後、1mlあたり 2×10^6 個の細胞数になるよう単一細胞懸濁液 (Hanks' BSS-20mM HEPES、pH 7.4)を調製した。

ロット番号602-2 (CS(S3)-PPEADP) の磷脂質結合コンドロイチン硫酸Cと、B16F10の単一細胞懸濁液 500μl (1×10^6 個細胞を、前述した細胞外マトリックスを調製した24穴培養皿に加え、37℃で1時間、5%炭酸ガス培養器内で静置した。

上清を静かに集め、さらにハンクス緩衝液で1回穏やかに洗った。その上清と洗液を合わせて、細胞外マトリックスに接着しなかった細胞としてその細胞数をコールターカウンター (コールター・エレクトロニクス社製)で計数した。対照としてロット番号602-2 (CS(S3)-PPEADP) を含まない緩衝液のみのもの (無添加) と、遊離のコンドロイチン硫酸Cを添加したものと比較した。

細胞の接着率は、最初に添加した全細胞数から計数した非接着細胞数を引き、その値を全細胞数で割った値を百分率で表した。その結果を表1-2に示す。

表 1-2

サンプル	添 加 量 (μg)	接 着 率 (%)
無 添加	-	82.8%
遊離コンドロイチン硫酸C	50μg	82.6%
602-2 (CS(S3)-PPEADP)	50μg	50.7%

この結果から、本発明の磷脂質結合グリコサミノグリカンは血管内皮細胞の細胞外マトリックスに対する高転移性癌細胞の接着を抑制することがわかる。遊離のコンドロイチン硫酸Cではそのような作用は全く認められなかった。

4. 図面の簡単な説明

図1～5は、磷脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンの薄層クロマトグラフィーを示し、図1は実施例1-(2)-1の目的物、図2は実施例1-(3)の目的物、図3は実施例3-(1)の目的物、図4は実施例4-(1)の目的物、図5は実施例4-(2)の目的物である。

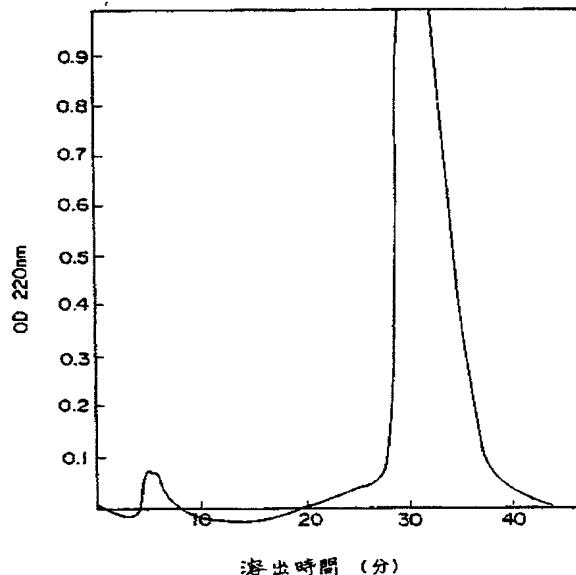


図 1

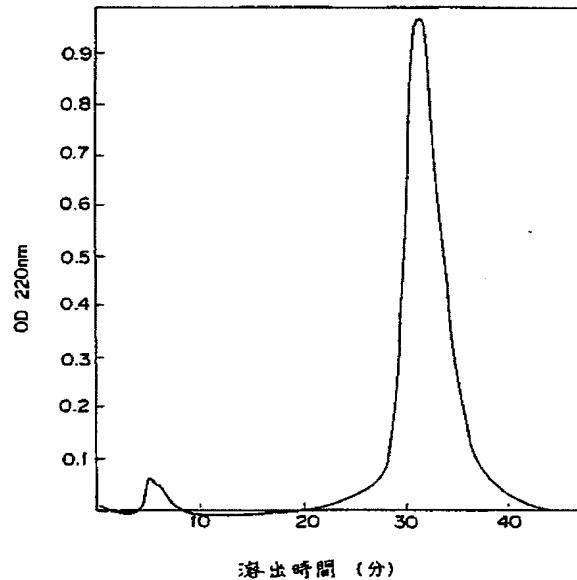


図 2

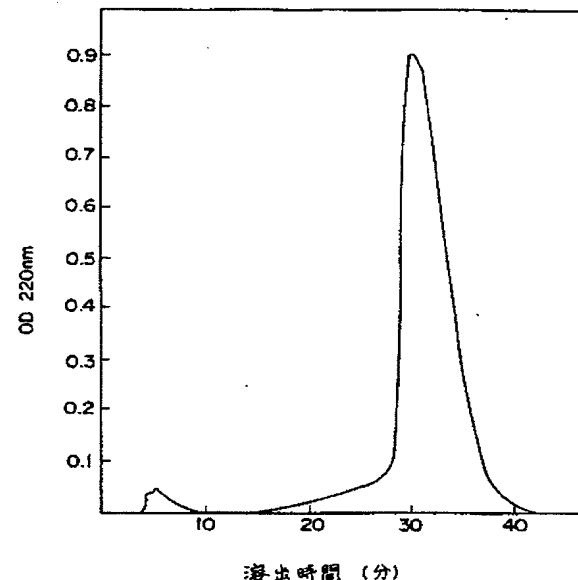


図 3

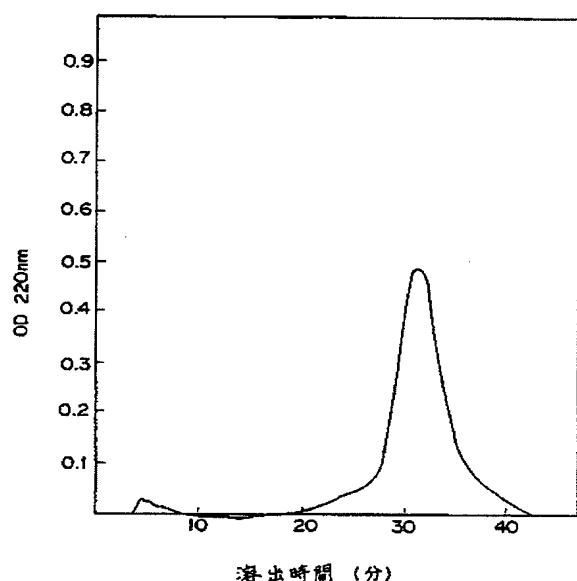


図 4

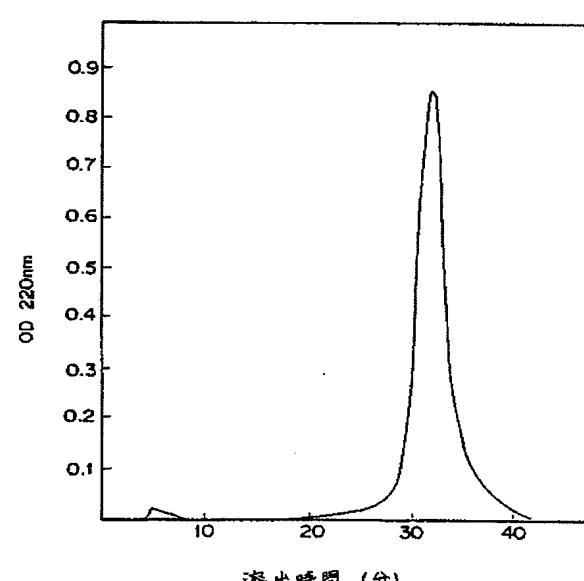


図 5

第1頁の続き

⑤Int.Cl. 5

C 08 B 37/00
37/10

識別記号

府内整理番号

H

7624-4C
7624-4C

手 続 程 正 書

平成 3年 7月 23日

特許庁長官 深沢 亘

1. 事件の表示

平成 2年特許願第 193817 号

2. 発明の名称

無脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名 称 生化学工業株式会社

4. 代 理 人

住 所 〒107 東京都港区赤坂2-10-8 第一信和ビル

氏 名 弁理士 (7866) 横田 雄一
電話 (3586) 1738~

5. 補正命令の日付 自発

6. 補正の対象 明細書の特許請求の範囲及び発明の詳細な説明の各欄

7. 補正の内容

I. 特許請求の範囲の欄

別紙 1 のとおり訂正する。

II. 発明の詳細な説明の欄

(1) 明細書 8 頁表 1 のコンドロイチン硫酸 D のヘキソサミンの欄の「GalNAc (4S)」を「GalNAc (6S)」と訂正する。

(2) 同 8 頁下から 7 行の「D-グルコサミン N-アセチル」を「N-アセチル D-グルコサミン」と訂正する。

(3) 同 8 頁下から 6 行の「D-ガラクトサミン N-アセチル」を「N-アセチル D-ガラクトサミン」と訂正する。

(4) 同 8 頁末行の「O-硫酸」を「O-硫酸」と訂正する。

(5) 同 9 頁 9 行~13 頁 3 行を別紙 2 のとおり訂正する。

(6) 同 14 頁 6 行及び 7 行の式 (IX) 及び式 (X) 中の



方 式
審査
市 川

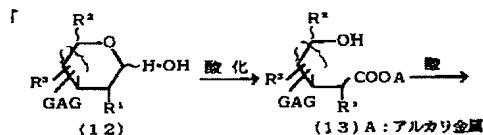
「
- O --- P - O - W を
| O H |」

を挿入する。

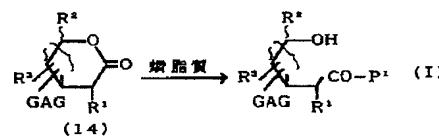
「
- O --- P - O - W と訂正する。
| O H |」

「上記還元末端ラクトン化法で製造される化合物を表Aに具体的に示す。

(7) 同16頁1~2行の反応式を次のとおり訂正する。



(13) A: アルカリ金属



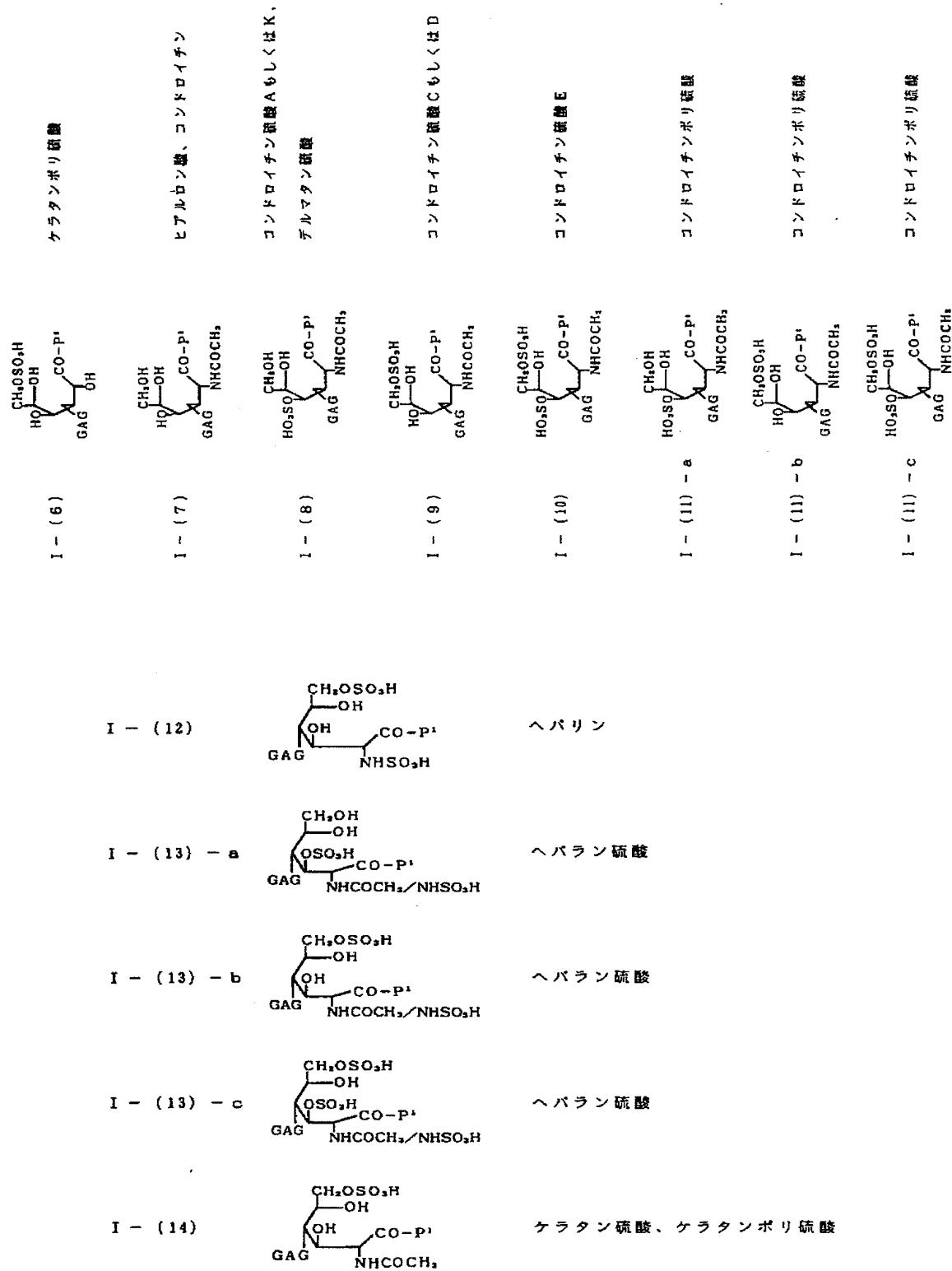
」

(8) 同16頁末行の「ヘパラン、」を「ヘパリン、」と訂正する。

(9) 同18頁下から4行と5行の間に次の記載

表 A

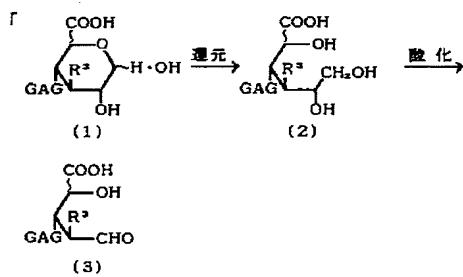
化合物番号	構造式	原料グリコサミノグリカン (GAG)
I - (1)		ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、CもしくはE、デルマチン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸
I - (2)		コンドロイチン硫酸D、ヘパリン、ヘパラン硫酸
I - (3)		コンドロイチン硫酸K
I - (4) - a		コンドロイチンボリ硫酸
I - (4) - b		コンドロイチンボリ硫酸
I - (4) - c		コンドロイチンボリ硫酸
I - (5)		ケラタン硫酸



特開平4-80201 (27)

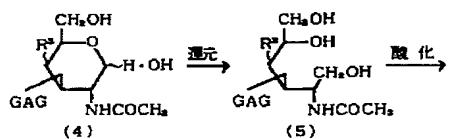
(10) 同 18 頁下から 1 ~ 2 行の「式 (3) ……ラクトン」を「式 (3)、(6)、(9) 及び (10) のアルデヒド化合物並びに式 (14) のラクトン化合物」と訂正する。

(11) 同 20 頁 1 行 ~ 2 行の反応式を次のとおり訂正する。

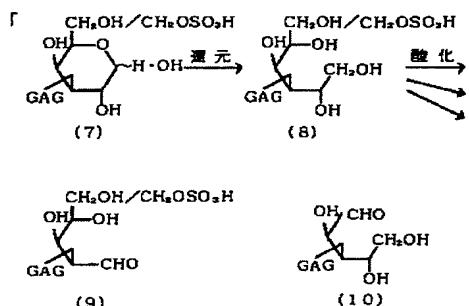


(12) 同 20 頁 2 行と 3 行の間に次の記載を挿入する。「(R² は前述と同じ)」

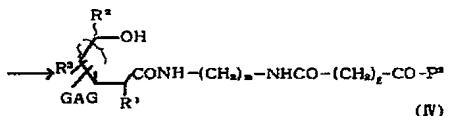
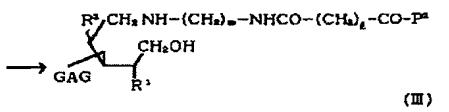
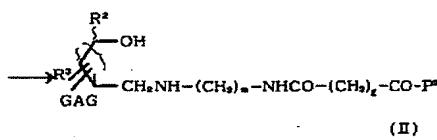
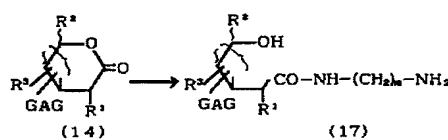
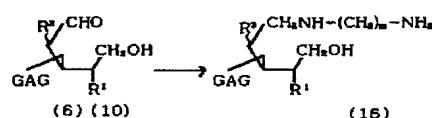
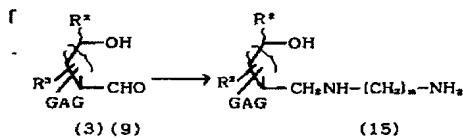
(13) 同 21 頁 1 ~ 2 行の反応式を次のとおり訂正する。



(14) 同 22 頁 1 ~ 2 行の反応式を次のとおり訂正する。



(15) 同 24 頁 5 行 ~ 同 25 頁 3 行の反応式を次のとおり訂正する。



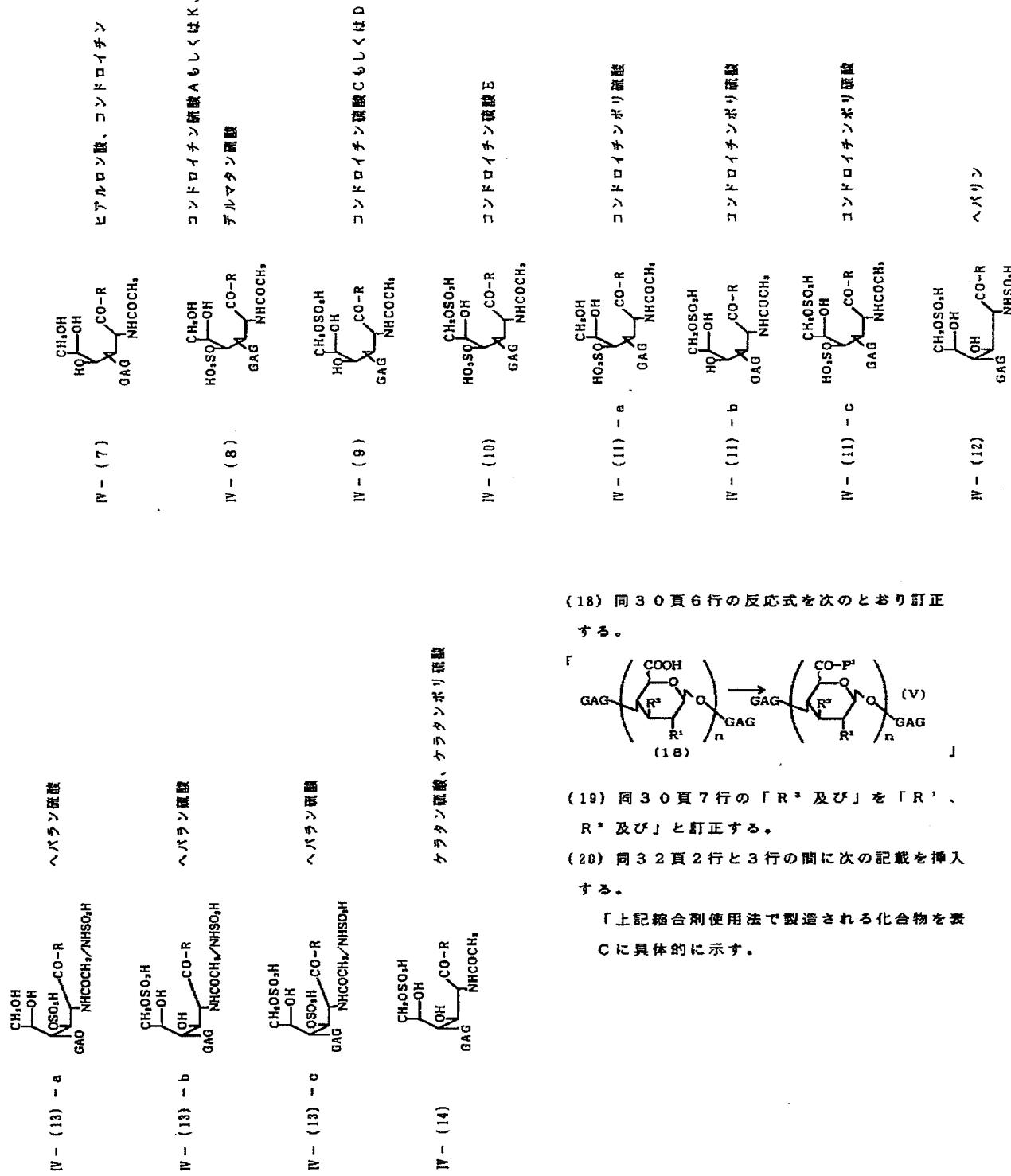
(16) 同 29 頁 7 行の「燐脂質」を「燐脂質又は脂質」と訂正する。

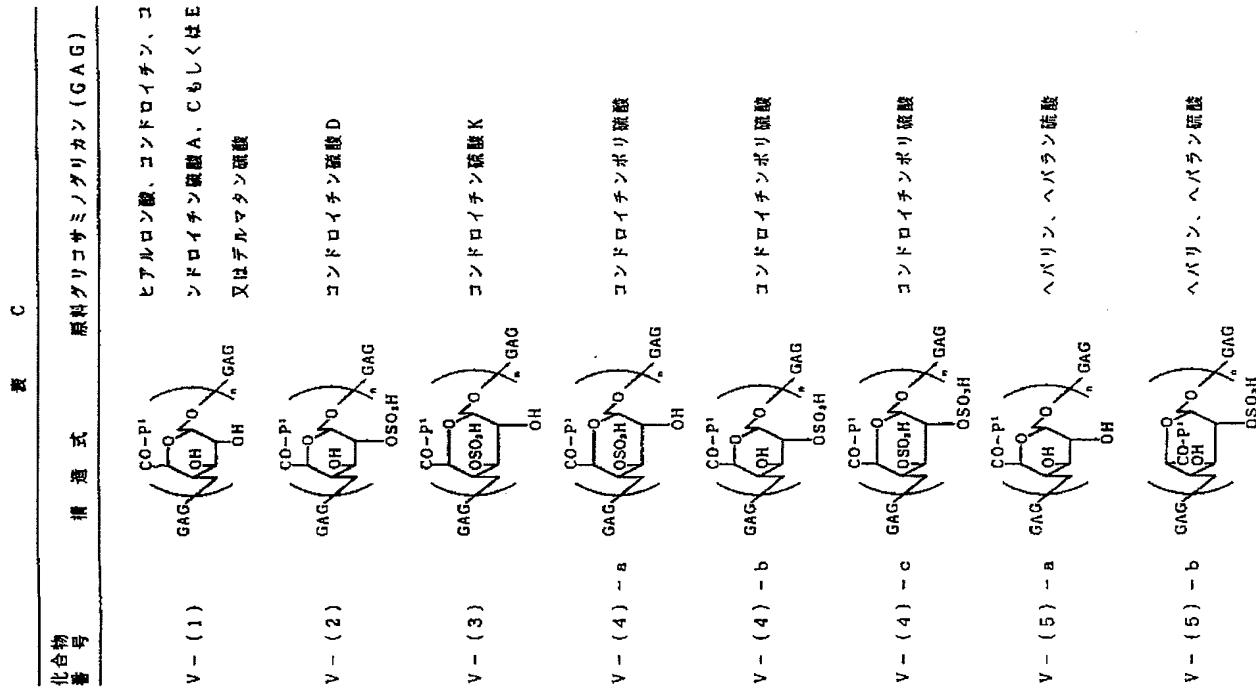
(17) 同 29 頁下から 5 行と 6 行の間に次の記載を挿入する。

「上記過元末端アミン法で製造される化合物を表 B に具体的に示す。」

表 B

		(R = NH - (CH ₂) ₄ - NHCO - (CH ₂) ₄ - CO - P ⁺)	
化合物 番号	構造式	別名	構造式
IV - (1)		ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸 A、C もしくは E、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘバラン硫酸	
IV - (2)		コンドロイチン硫酸 D、ヘパリン、ヘバラン硫酸	
IV - (3)		コンドロイチン硫酸 K	
IV - (4) - a		コンドロイチンポリ硫酸	
IV - (4) - b		コンドロイチンポリ硫酸	
IV - (4) - c		コンドロイチンポリ硫酸	
IV - (5)		ケラタン硫酸	
IV - (6)		ケラタン硫酸	





(21) 同34頁5行の「25~60」を「25~60℃」と訂正する。

(22) 同52頁表6及び表7のロット番号「602-1」を「602-2」と訂正する。

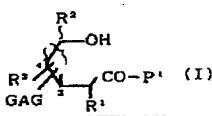
(23) 同55頁6行の「残基開環」を「限定酸化」と訂正する。

(24) 同59頁12~13行の「疎水クロマト…
…前記と同じ。」を削除する。

別紙1

特許請求の範囲

1. 一般式



を有する糖脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、Pⁱは1級アミノ基を有する糖脂質を示し。

(1) GAGがヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、CもしくはE、デルマクン硫酸、ヘパリン、又はヘバラン硫酸から還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、或いはデルマクン硫酸から還元性末端のイズロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R²は3位に置換し、R¹はOH基を示し、R³はCOOH基を示し、R⁴はOH基を示す。

(2) GAGがコンドロイチン硫酸Dから還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、或いはヘパリン又はヘパラン硫酸から還元性末端のイズロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R³は3位に置換し、R¹はOSO₃H基を示し、R²はCOOH基を示し、R³はOH基を示す。

(3) GAGがコンドロイチン硫酸Kから還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R³は3位に置換し、R¹はOH基を示し、R²はCOOH基を示し、R³はOSO₃H基を示す。

(4) GAGがコンドロイチンポリ硫酸から還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R³は3位に置換し、R¹およびR³の少なくとも一つはOSO₃H基を示し、他はOH基を示し、R²はCOOH基を示す。

(5) GAGがケラタン硫酸から還元性末端のガ

ラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R³は4位に置換し、R¹及びR³はOH基を示し、R²はCH₂OH基を示す。

(6) GAGがケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R³は4位に置換し、R¹及びR³はOH基を示し、R²はCH₂OSO₃H基を示す。

(7) GAGがヒアルロン酸又はコンドロイチンから還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R³は4位に置換し、R¹はNHCOCH₃基を示し、R²はCH₂OH基を示し、R³はOH基を示す。

(8) GAGがコンドロイチン硫酸AもしくはK又はデルマタン硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R³は4位に置換し、R¹はNHCOCH₃基を示し、R²はCH₂OH基を示す。

を示し、R³はOSO₃H基を示す。

(9) GAGがコンドロイチン硫酸C又はDから還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R³は4位に置換し、R¹はNHCOCH₃基を示し、R²はCH₂OSO₃H基を示し、R³はOH基を示す。

(10) GAGがコンドロイチン硫酸Eから還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R³は4位に置換し、R¹はNHCOCH₃基を示し、R²はCH₂OSO₃H基を示し、R³はOSO₃H基を示す。

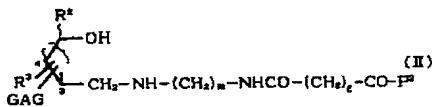
(11) GAGがコンドロイチンポリ硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R³は4位に置換し、R¹はNHCOCH₃基を示し、R²はCH₂OH基でR³はOSO₃H基を示すか、又はR²はCH₂OSO₃H基でR³はOH基もしくはOSO₃H基を示す。

(12) GAGがヘパリンから還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R³は3位に置換し、R¹はNHSO₃H基を示し、R²はCH₂OSO₃H基を示し、R³はOH基を示す。

(13) GAGがヘパラン硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R³は3位に置換し、R¹はNHCOCH₃基又はNHSO₃H基を示し、R²はCH₂OH基でR³はOSO₃H基を示すか、又はR²はCH₂OSO₃H基でR³はOH基もしくはOSO₃H基を示す。

(14) GAGがケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R³は3位に置換し、R¹は、NHCOCH₃基を示し、R²はCH₂OSO₃H基を示し、R³はOH基を示す。

2. 一般式



を有する糖脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、P¹は糖脂質又は脂質を示し、mは1~8を示し、lは1~10を示し。

(1) GAGがヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、CもしくはE、デルマタン硫酸、ヘパリン又はヘパラン硫酸から還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、或いはデルマタン硫酸から還元性末端のイズロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R¹は3位に置換し、R²はCOOH基を示し、R³はOH基を示す。

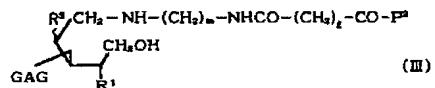
(2) GAGがコンドロイチン硫酸K又はコンドロイチンポリ硫酸から還元性末端のグルクロン酸

部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R¹は3位に置換し、R²はCOOH基を示し、R³はOSO₂H基を示す。

(3) GAGがケラタン硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R¹は4位に置換し、R²はCH₂OH基を示し、R³はOH基を示す。

(4) GAGがケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R¹は4位に置換し、R²はCH₂OSO₂H基を示し、R³はOH基を示す。

3. 一般式



を有する糖脂質又は脂質結合グリコサミノグリカ

ン又はその塩。

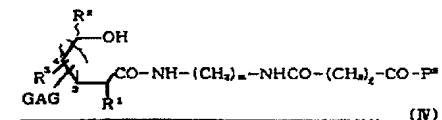
上記式中、m、l及びP¹は請求項2に記載と同じであり、

(1) GAGがヒアルロン酸又はコンドロイチンから還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、R¹はNHCOCH₃基を示し、R³はOH基を示す。

(2) GAGがコンドロイチン硫酸AもしくはK、コンドロイチンポリ硫酸又はデルマタン硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、R¹はNHCOCH₃基を示し、R³はOSO₂H基を示す。

(3) GAGがケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、R¹及びR³はOH基を示す。

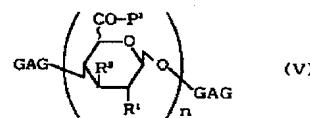
4. 一般式



を有する糖脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、GAG、R¹、R²及びR³は請求項1に記載と同じであり、m、l及びP¹は請求項2に記載と同じである。

5. 一般式



を有する糖脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、P¹は1級アミノ基を有する糖脂質を示し、R¹はグリコサミノグリカンに存在するカルボキシ基の数以下を示し。

(1) GAGがヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、CもしくはE、又はデルマタン硫酸のグリコサミノグリカン鎖のとき、R¹及びR²はOH基を示す。

(2) GAGがコンドロイチン硫酸Dのグリコサミノグリカン鎖のとき、R¹はOSO₃H基を示し、R²はOH基を示す。

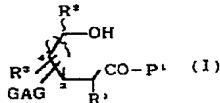
(3) GAGがコンドロイチン硫酸Kのグリコサミノグリカン鎖のとき、R¹はOH基を示し、R²はOSO₃H基を示す。

(4) GAGがコンドロイチンポリ硫酸のグリコサミノグリカン鎖のとき、R¹及びR²の少なくとも1つはOSO₃H基を示し、他はOH基を示す。

(5) GAGがヘパリン又はヘパラン硫酸のグリコサミノグリカン鎖のとき、R¹はOH基又はOSO₃H基を示し、R²はOH基を示す。

別紙2

(I) 一般式



を有する糖脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、P⁺は1級アミノ基を有する糖脂質を示し、

(1) GAGがヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、CもしくはE、デルマタン硫酸、ヘパリン、又はヘパラン硫酸から還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、或いはデルマタン硫酸から還元性末端のイズロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R¹は3位に置換し、R²はOH基を示し、R³はCOOH基を示す。

(2) GAGがコンドロイチン硫酸Dから還元性

末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、或いはヘパリン又はヘパラン硫酸から還元性末端のイズロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R¹は3位に置換し、R²はOSO₃H基を示し、R³はOH基を示す。

(3) GAGがコンドロイチン硫酸Kから還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R¹は3位に置換し、R²はOH基を示し、R³はCOOH基を示す。

(4) GAGがコンドロイチンポリ硫酸から還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R¹は3位に置換し、R²およびR³の少なくとも一つはOSO₃H基を示し、他はOH基を示す。

(5) GAGがケラタン硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン

残基のとき、GAGは3位に、R¹は4位に置換し、R²及びR³はOH基を示し、R²はCH₂OH基を示す。

(6) GAGがケラタン硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R¹は4位に置換し、R²及びR³はOH基を示し、R²はCH₂OSO₃H基を示す。

(7) GAGがヒアルロン酸又はコンドロイチンから還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R¹は4位に置換し、R²はNHCOCH₂基を示し、R³はCH₂OH基を示す。

(8) GAGがコンドロイチン硫酸AもしくはK又はデルマタン硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R¹は4位に置換し、R²はNHCOCH₂基を示し、R³はCH₂OH基を示す。

特開平4-80201(34)

(9) GAGがコンドロイチン硫酸C又はDから還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R³は4位に置換し、R¹はNHCOCH₃基を示し、R²はCH₂OSO₃H基を示し、R⁴はOH基を示す。

(10) GAGがコンドロイチン硫酸Eから還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R³は4位に置換し、R¹はNHCOCH₃基を示し、R²はCH₂OSO₃H基を示し、R⁴はOSO₃H基を示す。

(11) GAGがコンドロイチンポリ硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R³は4位に置換し、R¹はNHCOCH₃基を示し、R²はCH₂OH基でR⁴はOSO₃H基を示すか、又はR²はCH₂OSO₃H基でR³はOH基もしくはOSO₃H基を示す。

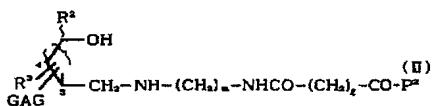
(12) GAGがヘパリンから還元性末端のヘキ

ソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R³は3位に置換し、R¹はNH₂SO₃H基を示し、R²はCH₂OSO₃H基を示し、R⁴はOH基を示す。

(13) GAGがヘパラン硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R³は3位に置換し、R¹はNHCOCH₃基又はNH₂SO₃H基を示し、R²はCH₂OH基でR⁴はOSO₃H基を示すか、又はR²はCH₂OSO₃H基でR³はOH基もしくはOSO₃H基を示す。

(14) GAGがケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R³は3位に置換し、R¹は、NHCOCH₃基を示し、R²はCH₂OSO₃H基を示し、R⁴はOH基を示す。

(II) 一般式



を有する糖脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、P⁴は糖脂質又は脂質を示し、mは1～8を示し、nは1～10を示し。

(1) GAGがヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、CもしくはE、デルマタン硫酸、ヘパリン又はヘパラン硫酸から還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、或いはデルマタン硫酸から還元性末端のイズロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R³は3位に置換し、R²はCOOH基を示し、R⁴はOH基を示す。

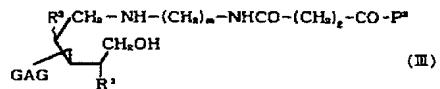
(2) GAGがコンドロイチン硫酸K又はコンドロイチンポリ硫酸から還元性末端のグルクロン酸

部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R³は3位に置換し、R²はCOOH基を示し、R⁴はOSO₃H基を示す。

(3) GAGがケラタン硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R³は4位に置換し、R²はCH₂OH基を示し、R⁴はOH基を示す。

(4) GAGがケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R³は4位に置換し、R²はCH₂OSO₃H基を示し、R⁴はOH基を示す。

(III) 一般式



を有する糖脂質又は脂質結合グリコサミノグリカ

ン又はその塩。

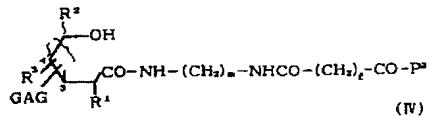
上記式中、 m 、 ℓ 及び P^2 は式(II)に記載と同じであり、

(1) GAG がヒアルロン酸又はコンドロイチンから還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、 R^1 は NHCOCH_3 基を示し、 R^2 は OH 基を示す。

(2) GAG がコンドロイチン硫酸 A もしくは K、コンドロイチンポリ硫酸又はデルマタン硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、 R^1 は NHCOCH_3 基を示し、 R^2 は OSO_3H 基を示す。

(3) GAG がケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、 R^1 及び R^2 は OH 基を示す。

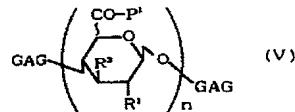
(IV) 一般式



を有する糖脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、GAG、 R^1 、 R^2 及び P^2 は式(I)に記載と同じであり、 m 、 ℓ 及び P^2 は式(II)に記載と同じである。

(V) 一般式



を有する糖脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、 P^1 は 1 級アミノ基を有する糖脂質を示し、 n はグリコサミノグリカンに存在するカルボキシ基の数以下を示し。

(1) GAG がヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸 A、C もしくは E、又はデルマタン硫酸のグリコサミノグリカン鎖のとき、 R^1 及び R^2 は OH 基を示す。

(2) GAG がコンドロイチン硫酸 D のグリコサミノグリカン鎖のとき、 R^1 は OSO_3H 基を示し、 R^2 は OH 基を示す。

(3) GAG がコンドロイチン硫酸 K のグリコサミノグリカン鎖のとき、 R^1 は OH 基を示し、 R^2 は OSO_3H 基を示す。

(4) GAG がコンドロイチンポリ硫酸のグリコサミノグリカン鎖のとき、 R^1 及び R^2 の少なくとも 1 つは OSO_3H 基を示し、他は OH 基を示す。

(5) GAG がヘパリン又はヘパラン硫酸のグリコサミノグリカン鎖のとき、 R^1 は OH 基又は OSO_3H 基を示し、 R^2 は OH 基を示す。

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第3区分

【発行日】平成11年(1999)2月9日

【公開番号】特開平4-80201

【公開日】平成4年(1992)3月13日

【年通号数】公開特許公報4-803

【出願番号】特願平2-193817

【国際特許分類第6版】

C08B 37/08

A61K 31/725

31/73 ADU

C08B 37/00

37/10

【F I】

C08B 37/08 Z

A61K 31/725

31/73 ADU

C08B 37/00 H

37/10

特許平3年7月23日付

平成6年2月24日

特許庁長官 寺井 寿光

1. 事件の表示

平成2年特許第193817号

2. 補正をする者

事件との関係 特許出願人
名 称 生化学工業株式会社

3. 代理人

住 所 〒105 東京都港区虎ノ門1丁目22番12号
S V A X T Sビル
氏 名 井澤士 (7866) 保 国 譲
TEL(3502)7212

4. 補正対象書類名 明細書

5. 補正請求項目名 特許請求の範囲及び発明の詳細な説明

6. 補正の内容

I. 特許請求の範囲の欄

別紙1のとおり訂正する。

II. 発明の詳細な説明の欄

(1) 平成3年7月23日付手続補正書のII-(5)の記載を撤回し、明細書9頁7行～13頁3行の記載を別紙2のとおり訂正する。

(2) 明細書15頁6～6行の「概要」の後に、次の記載を挿入する。

「例えばモノアシルグリセロール、ジアシルグリセロール、エーテル脂質、グリセロールモノステアレート及びグリセロールジステアレートなど。」

(3) 明細書15頁7行「細胞質」の後に、次の記載を挿入する。

「、例えばL-（α-ホスファチジル）エタノールアミン、DL-ホスファチジル-レセリン、エタノールアミンプラスマロゲン及びセリンプラスマロゲンなど」

〔別添1〕

特許請求の範囲

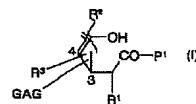
1. グリコサミノグリカンの還元末端に化学的修飾により形成された基又はグリコサミノグリカンのウロドヒド基の官能基と、脂質もしくは脂質の官能基又はこれらに導入されたジカルボン酸の官能基との反応生成物である脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン。

2. グリコサミノグリカンの還元末端に化学的修飾により形成された基がカルボニル基又はアミノ基である、請求項1記載の脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン。

3. カルボニル基が、グリコサミノグリカンの還元末端基を還元して開裂し、部分酸化して得られたアルデヒド基のカルボニル基であるか、グリコサミノグリカンの還元末端基を酸化して開裂し、次いで形成されたラクトンのカルボニル基である、請求項2記載の脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン。

4. アミノ基が、グリコサミノグリカンの還元末端に化学的修飾により形成されたカルボニル基とアルキレンジアミンとの反応により導入されたアミノ基である、請求項2記載の脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン。

5. 一般式

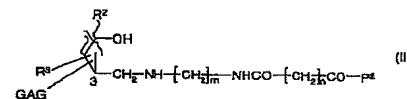


を有する脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、P¹は1級アミノ基を有する脂質残基を示し；GAGは、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチン硫酸D、コンドロイチン硫酸E、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸及びケラタンポリ硫酸からなる群から選択されるグリコサミノグリカンから還元性末端のウロドヒド部分又はガラクトース部分を除いたグリコ

サミノグリカン残基を示し；R¹はOH、OSO₂H、NHCOCH₂又はNHSO₂Hを示し；R²はCOOH、CH₂OH又はCH₂OSO₂Hを示し；R³はOH又はOSO₂Hを示す。

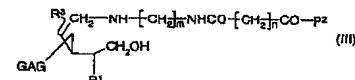
6. 一般式



を有する脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、P²は脂質残基又は脂質残基を示し；mは1～8を示し；nは1～10を示し；GAGは、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチン硫酸E、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸及びケラタンポリ硫酸からなる群から選択されるグリコサミノグリカンから還元性末端のウロドヒド部分又はガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し；R¹はCOOH、CH₂OH又はCH₂OSO₂Hを示し；R²はOH又はOSO₂Hを示す。

7. 一般式

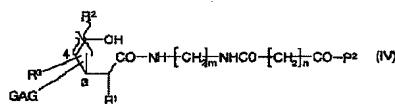


を有する脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、P²は脂質残基又は脂質残基を示し；mは1～8を示し；nは1～10を示し；GAGは、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチン硫酸E、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンポリ硫酸及びデルマタン硫酸からなる群から選択されるグリコサミノグリカンから還元性末端のウロドヒド部分又はヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し；R¹はCOOH、CH₂OH又はCH₂OSO₂Hを示し；R²はOH又はOSO₂Hを示す。

リソ酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し；R¹はOH又はNHCOCH₂を示し；R²はOH又はOSO₂Hを示す。

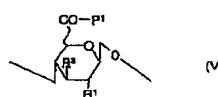
8. 一般式



を有する脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、GAG、R¹、R²及びR³はそれぞれ請求項5に記載と同じであり、m、n及びP¹は請求項7に記載と同じである。

9. 下記構造式に示すウロドヒド残基を有する脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。



上記構造式中のP¹は1級アミノ基を有する脂質を示し；R¹はOH又はOSO₂Hを示し；R²はOH又はOSO₂Hを示す。

10. グリコサミノグリカンの還元性末端のウロドヒド部分、ガラクトース部分又はヘキソサミン部分を酸化することにより該末端部分を開裂させた後、該処理することにより該開裂部にラクトン構造を形成させ、当該ラクトン構造に1級アミノ基を有する脂質P¹を直接結合させると、あるいはNHNH₂-(CH₂)_n

-NH₂を結合させた後、HOOC-(CH₂)_n-COOHに結合したP¹で示される脂質又は脂質を結合させることを特徴とする、請求項5又は8記載の脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンの製造方法。

11. グリコサミノグリカンの還元性末端のウロドヒド部分、ガラクトース部分又はヘキソサミン部分を還元することにより開裂し、さらに部分酸化により当該開裂部にアルデヒドを形成させ、当該アルデヒドにNH₂-(CH₂)_n-NH₂を結合させた後、HOOC-(CH₂)_n-COOHに結合したP¹で示される脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンの製造方法。

12. グリコサミノグリカンの還元性末端のウロドヒド基の官能基と、脂質又は脂質の1級アミノ基とを化学的に結合させることを特徴とする、請求項9記載の脂質結合グリコサミノグリカンの製造方法。

13. 化学的に結合させると反応を、結合剤の存在下に行なうか、あるいはクロロ酢酸のカルボキシル基を活性化して行なうとを特徴とする、請求項13記載の脂質結合グリコサミノグリカンの製造方法。

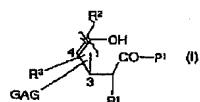
14. グリコサミノグリカンが、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチン硫酸D、コンドロイチン硫酸E、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸及びケラタンポリ硫酸からなる群から選択されるグリコサミノグリカンであることを特徴とする、請求項10～14いずれか一項記載の脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンの製造方法。

(別紙2)

「本発明の燃脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンはグリコサミノグリカンの還元末端に直鎖又はスペーサーを介して燃脂質又は脂質が結合したもの、あるいは構成クロトン酸のカルボキシル基に燃脂質又は脂質が結合したものである。前者はグリコサミノグリカンの還元末端に構脂質又は脂質が化学的に結合しているものである限りその結合方法は限定されず、燃脂質又は脂質と直鎖結合していくもの、あるいはスペーサーを介して結合していくものよい。また後者はグリコサミノグリカンの糖鎖骨格の構成糖の官能基に、燃脂質又は脂質が結合又はスペーサーを介して結合しているものであるよい。」

本発明のグリコサミノグリカンの運送末端に脂質又は脂質が結合した脂質又は脂質グリコサミノグリカンは以下の(1)～(4)が例示され、種々骨格の内部接着基に脂質又は脂質が結合した(1)脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンは以下の(5)に例示される。

(1) 一般式

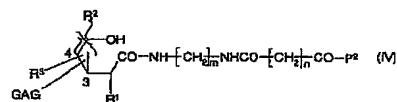


を有する燐脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、P¹ は 1 級アミノ基を有する脂肪族残基を示し: GAG は、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸 A、コンドロイチン硫酸 C、コンドロイチン硫酸 D、コンドロイチン硫酸 E、コンドロイチン硫酸 K、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸及びラクタノボリ硫酸からなる群から選択されるグリコサミングリカンから選択されるウロコン酸部分、ガラクトース部分又はヘキソサミン部分を除いたグリコサミングリカン残基を示し; R¹ は OH、OSO₂H、NHCOCH₃ 又は NHSO₂H を示し; R² は COOH、CH₂OH 又は CH₂OSO₂H を示し; R³ は OH 又は OSO₂H を示す。

示す。

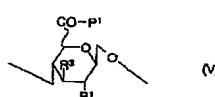
(4) 一般式



を有する磷脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

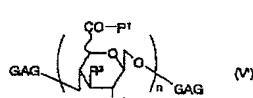
上記式中、GAG、R¹、R² 及びR³ は上記(1)に記載と同じであり、
而、P 及びP¹ は上記(2)に記載と同じである。

(5) グリコサミノグリカン中に、下記構造式で示す構造のウロコ酸残基を1又は2以上有する饱和又は不饱和糖鎖グリコサミノグリカン又はその複合物。



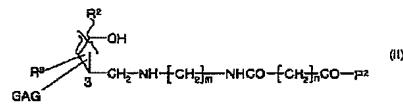
上記構造式中の P' は 1 級アミノ基を有する環状質残基を示し; R' は OH 又は OSO_2H を示し; R'' は OH 又は OSO_2H を示す。

なお、便宜的に上記式 (V) の構造は本明細書中において下記の構造式 (V') で示す。



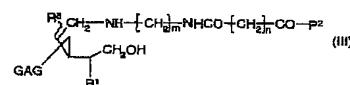
式中GAGは、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチン硫酸D、コンドロイチン硫酸E、コンドロイチン硫酸B、コンドロイチン硫酸F、コンドロイチン硫酸G、コンドロイチン硫酸H、コンドロイチン硫酸I、コンドロイチン硫酸J、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチン硫酸L、コンドロイチン硫酸M、コンドロイチン硫酸N、コンドロイチン硫酸O、コンドロイチン硫酸P、コンドロイチン硫酸Q、コンドロイチン硫酸R、コンドロイチン硫酸S、コンドロイチン硫酸T、コンドロイチン硫酸U、コンドロイチン硫酸V、コンドロイチン硫酸W、コンドロイチン硫酸X、コンドロイチン硫酸Y、コンドロイチン硫酸Z。

(2) 一般式



を有する燐脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

(3) 一般式



を有する機能質結合クリコサミノグリカン又はその塩-

上記式中、 P^{\pm} は換算質残基又は脂質残基を示し； m は1～8を示し； n は1～10を示し；GAGは、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンポリ硫酸及びデルマタン硫酸からなる群から選択されるグリコサミングリカンから還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミングリカン残基、又はケラチラン残基あるいはケラチラン硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミングリカン残基を示し； R^1 はOH又は HCOCH_3 を示し； R^2 はOH又は OSO_3Na を示し。

ら選択されるグリコサミノグリカンを示す。

本明細書中ににおける化学構造式に記載の波線は、当該波線に結合した基の化学構造式中での炭素原子への結合の上下の向き、すなわち立体配置が明記されないことを示す；片括弧によりまとめられた構造に結合する基は、当該構造が存在する範囲で記載された基の、徴記箇所前記に3位及び4位であった炭素原子にそれぞれ結合するものではその位置と特に明記はされないことを示す。」